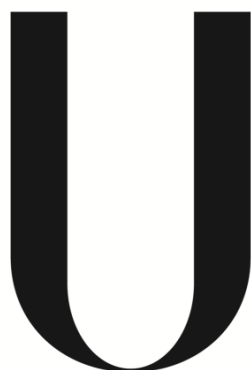


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

Determinação Vestigial de Agroquímicos em Matrizes  
Aquosas por Micro-extração Adsorptiva em Barra (BA $\mu$ E)

João Rodrigo Esteves da Bernarda

Dissertação  
Mestrado em Química  
Química

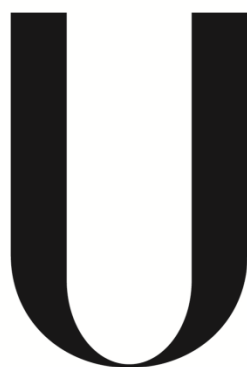
2014







UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

Determinação Vestigial de Agroquímicos em Matrizes  
Aquosas por Micro-extração Adsorptiva em Barra (BA $\mu$ E)

João Rodrigo Esteves da Bernarda

Dissertação

Mestrado em Química

Química

Dissertação orientada pelo

Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

2014



*Aos meus pais, irmã,  
cunhado e sobrinha*





## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira por me ter dado conhecimento do trabalho desenvolvido no seu grupo de investigação e de me ter aceite e orientado durante a presente dissertação. Agradeço ainda os conhecimentos científicos que me transmitiu, a paciência, o incentivo e disponibilidade em discutir e fornecer conselhos durante a realização deste trabalho.

Quero agradecer ainda ao Doutor Nuno Neng e ao Mestre Carlos Almeida pela disponibilidade de atendimento às minhas dúvidas constantes, à enorme paciência, boa disposição, amizade e bons conselhos prestados na realização deste trabalho.

Um enorme obrigado aos meus colegas e amigos de laboratório, Samir Marcos Ahmad, Bruno Bôto e Isabel Silva, pela permanente disponibilidade e paciência em ajudar, bom ambiente de trabalho, amizade e constante partilha de experiências. Um obrigado também aos colegas da “massa”, Sofia Alves, Tiago Jorge, Emma Gomes e Ana pelos bons momentos de convívio.

Um muito obrigado ao pessoal lá de casa (Luís Nobre, Samuel Casaca, João Nunes, Ruben Abreu e Maria João) por toda a força e ânimo que me transmitiram ao longo do meu percurso académico e em particular durante a realização desta dissertação.

Um agradecimento muito especial à minha namorada Margarida Guedes, por todo o apoio, carinho, compreensão e calma transmitidos nos momentos mais difíceis.

E por fim, quero agradecer à minha família, pois são hoje a razão da minha existência e o pilar da minha estabilidade, principalmente aos meus pais, à minha irmã, à nova estrela da família, a minha sobrinha, e ao meu cunhado pela preocupação constante, pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim na concretização dos vários desafios que tenho enfrentado ao longo da vida.

O meu Muito Obrigada a todos.



## Resumo

A utilização excessiva de agroquímicos na agricultura nas últimas décadas levaram à contaminação de recursos aquáticos, provocando efeitos nefastos para a saúde ambiental e humana. Tendo em conta esta preocupação e o número crescente de agroquímicos detetados em concentrações indesejadas, é de todo o interesse o desenvolvimento de métodos analíticos inovadores capazes de os determinar em matrizes com potencial de contaminação.

Nesta perspetiva, o objetivo do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de uma nova metodologia analítica, baseada na micro-extração adsortiva em barra com dessorção líquida, seguida de análise por injeção de grandes volumes-cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (BA $\mu$ E-LD/LVI-GC-MS) para a determinação vestigial de cinco agroquímicos modelo (alacoloro, diniconazol, fenpropatrina e os isómeros *cis/trans*-permetrina) em matrizes aquosas.

Numa primeira abordagem selecionou-se o material sorvente mais adequado para microextrair os analitos em estudo, nomeadamente o polímero de estireno divinilbenzeno (P1) uma vez ter, demonstrado melhor seletividade e maior eficiência relativamente a outras fases alternativas. Para otimização da metodologia desenvolvida (BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS), foram efetuados estudos sistemáticos a diversos parâmetros, tendo-se chegado às seguintes condições experimentais: extração: 4 h (1000 rpm), pH 2 e 10 % em metanol; retro-extração: acetonitrilo (30 min), com tratamento ultrassónico. Sob condições experimentais otimizadas obtiveram-se recuperações compreendidas entre 55,2 e 105,6 % para os agroquímicos em estudo. A metodologia revelou ainda, excelente linearidade ( $r^2 > 0,9982$ ) na gama de concentrações compreendida entre 0,03 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , tendo-se alcançado LODs e LOQs nas gamas 8,0 - 32,0  $\text{ng L}^{-1}$  e 26,4 - 105,6  $\text{ng L}^{-1}$ , respetivamente. Com recurso ao método da adição de padrão, a aplicação da metodologia a matrizes de água superficial e subterrânea, assim como de amostras de vinho, permitiram alcançar ótimas linearidades ( $r^2 > 0,9911$ ), não se tendo detetado quaisquer contaminações ( $< \text{LOD}$ ) dos cinco agroquímicos estudados.

A metodologia apresentou como principais vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra, volumes negligenciáveis em solventes, tempo analítico conveniente, baixo custo e fácil manipulação, associada a rapidez, simplicidade e bom desempenho analítico.

## **Palavras-chave**

Agroquímicos

Micro-extração adsorptiva em barra (BA $\mu$ E)

Análise vestigial

LVI-GC-MS(SIM)

Matrizes de água ambiental e alimentares

## Abstract

The excessive use of agrochemicals in agriculture in last recent decades leads to the contamination of water resources, causing adverse effects to environmental and human health. Due to this concern, as well as the growing number of agrochemicals detected in unwanted concentrations, there is interest in the development of novel analytical methods able for the determination in matrices with potential of contamination.

In this perspective, the aim of this work was the development of a new analytical methodology, based on bar adsorptive micro-extraction with, liquid desorption followed by large volume injection-gas chromatography coupled to mass spectrometry (BA $\mu$ E-LD/LVI-GC-MS) for the determination of traces of five agrochemicals model (alachlor, diniconazole, fenpropathrin and *cis/trans*-permethrin isomers) in aqueous matrices.

In a first approach, the selection of the most suitable sorbent materials to microextract the analytes under study, namely the divinylbenzene styrene copolymer (P1), since it showed better selectivity and higher extraction efficiency in relation to other alternative phases. For optimization of the developed methodology (BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS), systematic studies have been conducted for several parameters, in which the following experimental conditions were achieved: extraction: 4 h (1000 rpm), pH 2 and 10 % metanol; back-extraction: acetonitrile (30 min), with ultrasonic treatment. Under optimized experimental conditions, recovery yields ranging from 55.2 to 105.6 % were achieved for the agrochemicals under study. The methodology also showed excellent linearity ( $r^2 > 0.9982$ ) in the concentrations between 0.03 and 4.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , LODs and LOQs in the ranges 8.0 - 32.0  $\text{ng L}^{-1}$  and 26.4 - 105.6  $\text{ng L}^{-1}$ , respectively. By using the standard addition method, the application of the developed methodology to surface and underground water matrices, as well as to wine samples, allowed to achieve optimum linearity ( $r^2 > 0.9911$ ), without any detected contamination ( $< \text{LOD}$ ) for the five agrochemicals studied.

The methodology presented as major advantages the use of small amounts of sample and negligible volumes of solvents, convenient analytical time, low cost and easy manipulation, combined with speed, simplicity and good analytical performance.

## **Keywords**

Agrochemicals

Bar adsorptive micro-extraction (BA $\mu$ E)

Trace analysis

LVI-GC-MS(SIM)

Environmental water and food matrices

## **Abreviaturas, acrónimos e símbolos**

ACN	Acetonitrilo
AC	Carvão ativado
ALA	Alacloro
BA $\mu$ E	Micro-extração adsortiva em barra
CE	Eletroforese capilar
<i>Cis/trans</i> -PERM	Isómeros <i>cis</i> e <i>trans</i> da Permetrina
DIN	Diniconazol
DLLME	Micro-extração dispersiva líquido-líquido
DVB	Estireno divinilbenzeno
ECD	Detetor de captura eletrónica
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FID	Detetor de ionização de chama
FEN	Fenprotrina
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O	Água
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Espaço de cabeça
LC-MS	Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa
LD	Dessorção líquida
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LVI	Injeção de grandes volumes
MeOH	Metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NPD	Detetor de azoto-fósforo

RSD	Desvio padrão relativo
SAM	Método da adição de padrão
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SIM	Monitorização de iões selecionados
S/N	Razão sinal/ruído
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro-extração em fase sólida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDMS	Polidimetilsiloxano
P	Polímero
PTV	Injetor de vaporização com temperatura programada
PS-DVB	Poliestireno divinilbenzeno
TCD	Detetor de condutividade térmica
USEPA	Agência de protecção ambiental dos Estados Unidos
VMA	Valor máximo admissível
$\alpha$	Seletividade
$\sigma$	Desvio padrão
$\bar{x}$	Média
$A_{\text{Esperada}}$	Área esperada para o composto
$A_{\text{Obtida}}$	Área obtida para o composto
$c$	Concentração
$c_S$	Concentração de um componente na fase estacionária
$c_M$	Concentração de um componente na fase móvel
$c_{\text{PDMS}}$	Concentração do analito na fase de PDMS
$c_W$	Concentração do analito na fase aquosa
Da	Dalton
$K$	Coeficiente de distribuição
$K_{O/W}$	Coeficiente de partição octanol-água
$K_{\text{PDMS}/W}$	Coeficiente de partição PDMS-água
$k'$	Fator de capacidade
$m_{\text{PDMS}}$	Massa do analito na fase de PDMS
$m_W$	Massa do analito na fase aquosa
N	Eficiência



pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração em hidrogeniões
pK <sub>a</sub>	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
R <sub>s</sub>	Resolução
t <sub>M</sub>	Tempo morto
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
t <sub>R</sub> '	Tempo de retenção ajustado
V <sub>PDMS</sub>	Volume em PDMS
V <sub>W</sub>	Volume de amostra aquosa
W	Largura do pico
%	Percentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
m/z	Razão massa/carga
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
rpm	Rotações por minuto
ms	Milisegundo
V	Volt
eV	Eletrão-volt



# Índice

<i>Índice de figuras</i> .....	xxii
<i>Índice de tabelas</i> .....	xxvi
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. <i>Evolução da utilização de agroquímicos</i> .....	3
1.2. <i>Agroquímicos - Definição e classificação</i> .....	4
1.3. <i>Contaminação de fontes de água superficial e subterrâneas</i> .....	4
1.4. <i>Efeitos dos agroquímicos na saúde humana</i> .....	5
1.5. <i>Legislação referente aos agroquímicos</i> .....	6
1.6. <i>Metodologias analíticas para análise vestigial de agroquímicos</i> .....	6
1.7. <i>Técnicas de extração sortiva</i> .....	7
1.7.1. <i>Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)</i> .....	8
1.7.2. <i>Micro-extração adsorção em barra (BA<math>\mu</math>E)</i> .....	11
1.8. <i>Técnicas cromatográficas</i> .....	12
1.8.1. <i>Breve nota histórica</i> .....	12
1.8.2. <i>Processo cromatográfico e aspetos teóricos</i> .....	13
1.9. <i>Cromatografia em fase gasosa (GC)</i> .....	16
1.9.1. <i>Cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)</i> .....	18
1.10. <i>Objetivos</i> .....	19
<b>2. Parte experimental</b> .....	21
2.1. <i>Reagentes químicos, padrões analíticos, materiais sorventes e amostras</i> .....	23
2.2. <i>Materiais e equipamentos</i> .....	24
2.3. <i>Método experimental</i> .....	24

2.3.1. Preparação das soluções padrão.....	24
2.3.2. Condições instrumentais.....	25
2.3.3. Calibração instrumental.....	25
2.3.4. Preparação dos dispositivos de BAμE.....	26
2.3.5. Ensaios de otimização e validação.....	26
2.3.6. Ensaios de aplicação a amostras reais.....	27
<b>3. Discussão de resultados.....</b>	<b>29</b>
3.1. Otimização instrumental.....	31
3.2. Seleção do material sorvente.....	34
3.3. Otimização da retro-extração (LD).....	35
3.3.1. Efeito do tipo de solvente.....	36
3.3.2. Efeito do tempo de dessorção.....	37
3.4. Otimização BAμE(P1).....	38
3.4.1. Efeito da velocidade de agitação.....	38
3.4.2. Efeito do tempo de equilíbrio.....	39
3.4.3. Efeito do pH.....	40
3.4.4. Efeito do modificador orgânico.....	41
3.4.5. Efeito da força iônica.....	42
3.5. Condições experimentais otimizadas (BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM)).....	44
3.6. Validação do método BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM).....	45
3.6.1. Limiares analíticos.....	45
3.6.2. Gama de dinâmica de trabalho/linearidade.....	45
3.7. Aplicação a matrizes reais.....	47
3.7.1. Amostras de água superficial.....	47
3.7.2. Amostras de água subterrânea.....	48
3.7.3. Amostras de vinho.....	50

<b>4. Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>53</b>
<b>5. Referências bibliográficas .....</b>	<b>57</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>
Anexo I. – Espectros de massa dos compostos estudados obtidos por GC-MS.....	iii
Anexo II. – Especificação dos compostos em função do pH obtidos pelo programa Marvin 6.2.2.	vi
Anexo III. – Curvas de calibração instrumental (LVI-GC-MS(SIM)).....	x
Anexo IV. – Curvas de calibração do método BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM) .....	x
Anexo V. – Curvas de calibração obtidas pelo método da adição de padrão para as matrizes reais.....	xi
Anexo VI. – Fórmulas utilizadas para o cálculo das recuperações .....	xiii

## **Índice de figuras**

### **1. Introdução**

Figura 1.1 - Esquema simplificado do comportamento dos agroquímicos no ambiente, em particular no ar e no solo [7].	5
Figura 1.2 - Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE [21].	8
Figura 1.3 - Recuperações teóricas de SPME (PDMS: 0,5 $\mu$ L) e SBSE (PDMS: 50 $\mu$ L) em função do coeficiente de partição de octanol-água em idênticas condições experimentais. Adaptado de [18]	10
Figura 1.4 - Representações esquemáticas e imagens exemplificativas de BA $\mu$ E. Legenda: 1 – Barra de polipropileno; 2 – Adesivo; 3 – Sorvente; 4 – Vial de extração; 5 – Vórtex; 6 – Dispositivo de micro-extração em barra; 7– Amostra; 8 – Barra de agitação magnética de Teflon. Adaptado de [27].	11
Figura 1.5 - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respectivos parâmetros de retenção. Adaptado de [33].	14
Figura 1.6 - Esquema simplificado de um cromatografo em fase gasosa [36].	16
Figura 1.7 - Esquema de um sistema de GC-MS [38]	18

### **3. Discussão de resultados**

Figura 3.1 - Estruturas químicas dos agroquímicos em estudo.[39]	31
Figura 3.2 - Cromatograma obtido por LVI-GC-MS(SIM) relativo aos agroquímicos estudados (1 mg L <sup>-1</sup> ) em condições instrumentais otimizadas. (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- cis-PERM; 5- trans-PERM).	32
Figura 3.3 - Efeito das diferentes fases sorventes usando AC1, AC2, AC3 e P1 na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu$ g L <sup>-1</sup> ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN, 200 $\mu$ L, 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).	35

Figura 3.4 - Efeito do solvente de retro-extração na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).....	36
Figura 3.5 - Efeito do tempo de retro-extração na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ ; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM). ....	37
Figura 3.6 - Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h, pH 5,5; retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM). ....	39
Figura 3.7 - Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 1000 rpm, pH 5,5; retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM). ....	40
Figura 3.8 - Efeito do pH na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm); retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).....	41
Figura 3.9 - Efeito do modificador orgânico na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm), pH 2; retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).....	42
Figura 3.10 - Efeito da força iônica na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm), pH 2; retro-extração: ACN, 200 $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM). ....	43
Figura 3.11 - Cromatograma relativo à amostra de água superficial fortificada a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- <i>cis</i> -PERM; 5- <i>trans</i> -PERM). ....	48

Figura 3.12 - Cromatograma relativo à amostra de água subterrânea fortificada a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  obtido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM). .....49

Figura 3.13 - Cromatograma relativo à amostra de vinho fortificada a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  obtido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVIC-GC-MS, nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM). .....51

## **Anexos**

Figura I.1- Espectro de massa caraterístico do ALA. .... iii

Figura I.2 - Espectro de massa caraterístico do DIN..... iii

Figura I.3 - Espectro de massa caraterístico do FEN. ....iv

Figura I.4 - Espectro de massa caraterístico da *cis*-PERM. ....iv

Figura I.5 - Espectro de massa caraterístico da *trans*-PERM. ....v

Figura II.1 - Possíveis formas de ionização de ALA obtidas pelo programa Marvin 6.2.2.....vi

Figura II.2 - Possíveis formas de ionização de DIN obtidas pelo programa Marvin 6.2.2. ....vii

Figura II.3 - Possíveis formas de ionização de FEN obtidas pelo programa Marvin 6.2.2. .... viii

Figura II.4 - Representação das moléculas *cis*(1)/*trans*(2)-permetrina.....ix

Figura III.1- Curvas de calibração instrumental obtidas para os cinco agroquímicos em estudo. ....x

Figura IV.1- Curvas de calibração obtidas para os cinco agroquímicos em estudo pelo método dos mínimos quadrados. ....x

Figura V.1 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de água superficial obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....xi



Figura V.2 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de água subterrânea obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....xi

Figura V.3 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de vinho obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....xii

## **Índice de tabelas**

### **3. Discussão de resultados**

Tabela 3.1 - Classificação dos agroquímicos em estudo de acordo com o modo de ação e classe química. ....	32
Tabela 3.2 - $\log K_{O/W}$ , tempo de retenção ( $t_R$ ) e iões selecionados para quantificação no modo SIM para os agroquímicos em estudo. ....	33
Tabela 3.3 - Tempos de retenção ( $t_R$ ), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama linear e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) dos cinco agroquímicos obtidos por LVI-GC-MS(SIM) em condições instrumentais otimizadas. ....	33
Tabela 3.4 - Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM). ....	44
Tabela 3.5 - Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM). ....	44
Tabela 3.6 - LODs e LOQs para os cinco agroquímicos estudados, obtidos na validação do método BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM). ....	45
Tabela 3.7 – Parâmetros de regressão relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia. ....	46
Tabela 3.8 - Ensaio de precisão obtidos por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM) fortificadas com 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em condições experimentais otimizadas. ....	46
Tabela 3.9 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de água superficial obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....	47
Tabela 3.10 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de água subterrânea obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....	49
Tabela 3.11 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de vinho obtida por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. ....	50

**Anexos**

Tabela II.1 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de ALA em função do pH. ....vi

Tabela II.2 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de DIN em função do pH.....vii

Tabela II.3 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de FEN em função do pH. ...viii



## ***1. Introdução***

---



Com o aumento da população mundial e a procura crescente de alimentos a aplicação de agroquímicos tornou-se vital nas práticas agrícolas. A sua intensiva utilização neste sector traduziu-se, de uma forma geral, num aumento da produtividade das colheitas mas também na melhoria das características dos alimentos com benefícios apreciáveis para a sociedade em geral. No entanto, o uso excessivo dos agroquímicos tem-se traduzido em preocupações sérias quanto à toxicidade que apresentam na saúde ambiental e humana, sendo a respetiva monitorização dos resíduos uma tarefa prioritária.

### ***1.1. Evolução da utilização de agroquímicos***

A utilização de agroquímicos é quase tão antiga como a agricultura [1]. O primeiro grande marco na história dos agroquímicos sintéticos foi a descoberta no século XIX, do Kerosene e do “Verde de Paris” para combater o escaravelho-da-batateira. No início da Segunda Guerra Mundial a seleção de inseticidas limitava-se a diversos compostos como o arsénico, a produtos com origem natural como a rotenona, as piretrinas e a nicotina, o enxofre e pouco mais [2]. De facto a Segunda Grande Guerra contribuiu para a introdução do conceito de controlo químico de pragas, com o reconhecimento das propriedades inseticidas, dos quais fazem parte o DDT (diclorodifeniltricloro etano). O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1874 pelo químico alemão Zeidler, contudo foi somente em 1939, que Paul Muller descobriu as suas propriedades inseticidas [1, 2]. Desde então inúmeros agroquímicos têm sido desenvolvidos e utilizados em todo o mundo, entre os quais os organoclorados, os organofosforados, os piretróides e os carbamatos, entre outros. Nos países industrializados, a partir da década de 60, assistiu-se ao processo de modernização da agricultura devido ao aparecimento de novas tecnologias, muitas delas baseadas na utilização intensiva de agroquímicos [3].

No entanto, com a introdução maciça de agroquímicos no mercado começaram a surgir os primeiros sinais de alarme relativamente à sua toxicidade. O uso irracional e excessivo de agroquímicos, principalmente na agricultura, conduziu à contaminação do meio ambiente, provocando efeitos ecotoxicológicos ao nível da fauna e flora acabando por afectar o Homem. No final do século passado começaram a concentrar-se esforços no desenvolvimento de novos tipos de agroquímicos, menos agressivos. Contudo, para controlar melhor a disseminação de agroquímicos no ecossistema, torna-se cada vez

mais necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com capacidade de monitorização vestigial destes compostos em diversos tipos de amostras. Por esse motivo, o desenvolvimento de técnicas de preparação de amostras complexas é uma necessidade, por forma a dar resposta a esta problemática, fundamentalmente em matrizes ambientais.

### ***1.2. Agroquímicos - Definição e classificação***

Os agroquímicos são definidos genericamente como um vasto grupo de compostos químicos sintéticos ou naturais utilizados para eliminar pragas e outras ameaças biológicas que atacam culturas agrícolas.

Segundo a definição internacional aceite pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS), um pesticida é definido como qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas na prevenção, controlo ou destruição de qualquer praga, infestante ou animal indesejável que interfira com a produção, armazenamento, transporte, distribuição e transformação de géneros alimentares, produtos agrícolas, madeira, alimentos ou animais [4].

Quanto à sua classificação existem vários tipos de agroquímicos e consequentemente várias formas de os classificar e agrupar. Por esse motivo, o sistema de classificação mais comum é o modo de ação. Esta classificação é feita de acordo com o tipo de organismo a combater, sendo divididos em inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, acaricidas entre outros [5]. Outra forma de classificá-los é quanto à sua classe química, sendo os agroquímicos divididos por famílias e sub-famílias químicas como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides entre outras.

### ***1.3. Contaminação de fontes de água superficial e subterrâneas***

No decorrer da última década, tem-se verificado uma grande preocupação relativamente à poluição do ambiente, em especial à contaminação da água, devido ao número crescente de agroquímicos detetados em concentrações acima dos limites fixados pela legislação.

Esta problemática surge devido ao uso indiscriminado de agroquímicos que tem contribuído para contaminação das águas superficiais e subterrâneas decorrentes de vários processos de transformação e transporte, nomeadamente, via arrastamento pelo



vento, escoamento superficial, drenagem e lixiviação (figura 1.1). Sendo uma fonte de poluição difusa no qual ocorre quando a água se movimenta à superfície ou através do solo e retira destas substâncias poluentes, as quais podem ser transportadas e depositadas em lagos, albufeiras, rios, zonas costeiras ou águas subterrâneas [6].

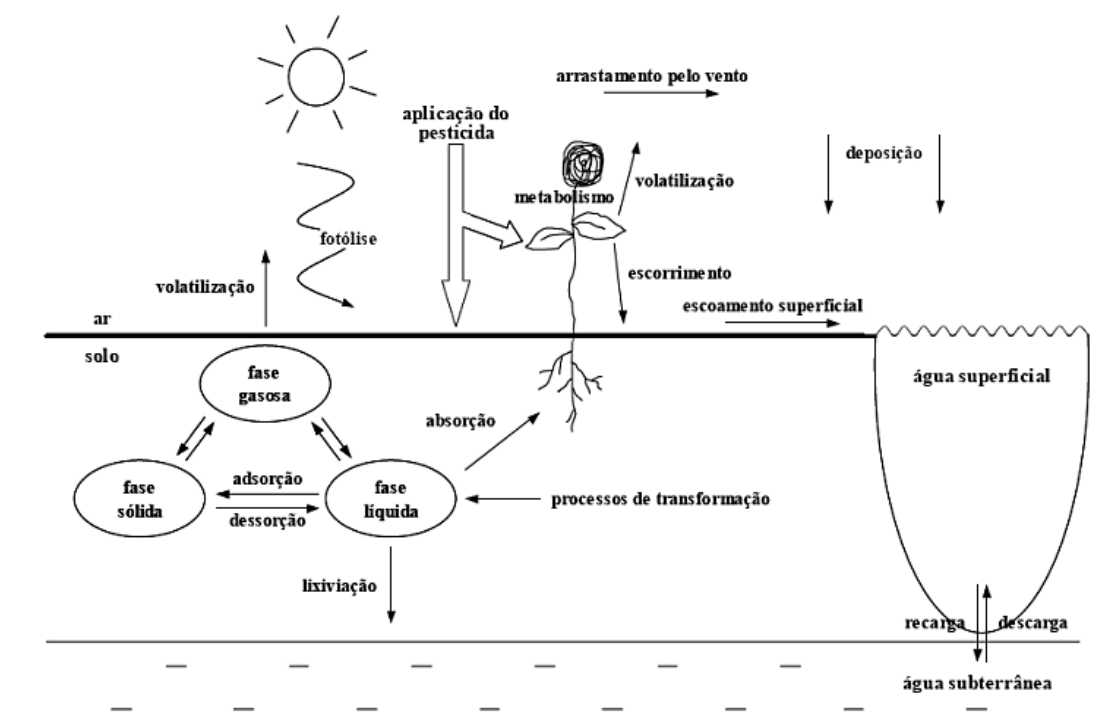


Figura 1.1 - Esquema simplificado do comportamento dos agroquímicos no ambiente, em particular no ar e no solo [7].

#### 1.4. Efeitos dos agroquímicos na saúde humana

Os agroquímicos são produtos tóxicos para os organismos em geral, cujos efeitos mais preocupantes são nomeadamente, os mutagénicos, carcinogénicos ou de disrupção endócrina. Genericamente, como muitos agroquímicos exibem grande estabilidade química, permitem a sua persistência em diversos meios durante períodos longos, resistir aos processos de biodegradação e serem eventualmente propagados ao longo da cadeia alimentar. São compostos que quando entram em contacto com o organismo atuam sobre os sistemas biológicos vitais como por exemplo ao nível do sistema nervoso, com a inibição da acetilcolinesterase ou da respiração e na inibição do transporte de eletrões nas mitocôndrias, tornando-se potencialmente tóxicos para os seres humanos [8].

Porém, o risco associado aos agroquímicos é variável e depende da fração de substância ativa biologicamente disponível e da concentração admissível no organismo. Por outro lado, dependem igualmente do tempo de exposição e lipofilicidade, sendo este último fator muito importante devido a facilidade de absorção por parte dos seres humanos.

### ***1.5. Legislação referente aos agroquímicos***

Em Portugal, a legislação existente segue a diretiva 98/83/EC da União Europeia (EU) na regulamentação de agroquímicos a monitorizar em águas para consumo humano estabelecendo 0,1 µg/L como valor máximo admissível (VMA) para os agroquímicos individuais e 0,5 µg/L para a soma de todos agroquímicos e produtos de degradação existentes na amostra [9]. No entanto, em águas superficiais e subterrâneas os VMAs sobem para valores compreendidos entre 1 e 3 µg/L [10].

Em outros países e organizações a regulamentação é estipulada com diferentes VMAs. Nos EUA os VMAs são definidos de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para cada estado pelo que por exemplo, na Florida é permitida a permetrina com um VMA de 350 µg/L para a água potável. Em oposição, a OMS recomenda, um VMA de 20 µg/L para a permetrina em água potável. [11].

A utilização de agroquímicos é ainda afetada pela legislação no domínio da água na EU, através do estabelecimento de normas de qualidade ambiental relativas a substâncias prioritárias e a outros poluentes, incluindo, entre as primeiras, diversos tipos de agroquímicos [12].

### ***1.6. Metodologias analíticas para análise vestigial de agroquímicos***

A determinação de resíduos agroquímicos em produtos agrícolas, plantas e amostras ambientais tem sido objeto de estudo durante muitos anos, devido aos efeitos nocivos para a saúde humana, persistência no ambiente e bioacumulação na cadeia alimentar [13].

Como tal, diversos investigadores têm desenvolvido e proposto novas metodologias analíticas capazes de determinar níveis vestigiais de ultra-traços de

agroquímicos, tornando possível a identificação e/ou quantificação de resíduos em diversas matrizes reais.

Recorre-se frequentemente às técnicas cromatográficas como a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na determinação de resíduos de agroquímicos em diferentes amostras de água e alimentos, podendo a sua confirmação estrutural ainda ser obtida por hifenação à espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS).

Porém, antes da análise instrumental, um dos passos mais importantes de um qualquer processo analítico é a respetiva preparação da amostra. Neste sentido, têm sido desenvolvidos vários métodos de preparação de amostras para análise de resíduos de agroquímicos com o intuito de extrair e concentrar, destacando-se a extração líquido-líquido (LLE) [6] e a extração em fase sólida (SPE) [8, 12]. No entanto, estas técnicas, em particular a LLE, incluem grande consumo de solventes orgânicos tóxicos, sendo na atualidade uma técnica ambientalmente pouco favorável, o que conduziu inevitavelmente ao desenvolvimento de alternativas mais limpas e “amigas do ambiente” [14]. Neste sentido, na atual era da “química verde” já não é admissível o consumo excessivo de solventes orgânicos tóxicos, devido ao impacto ambiental que isso acarreta [15]. Nesta perspetiva, têm surgido novos conceitos aliados a metodologias que conseguem conjugar a miniaturização analítica com redução ou mesmo eliminação do consumo de solventes orgânicos, para enriquecimento de compostos alvo em diversos tipos de matrizes.

Destacam-se neste contexto, a micro-extração dispersiva líquido-líquido (DLLME) [16, 17] e as técnicas de extração sortiva estáticas como a técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) e mais recentemente, a extração sortiva em barra de agitação (SBSE), que para além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa sensibilidade na recuperação de analitos alvo, elevada reprodutibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização [18].

### ***1.7. Técnicas de extração sortiva***

As técnicas de extração sortiva têm despertado grande interesse em particular nos últimos anos, dado o seu elevado potencial de recuperação analítica. Estas técnicas, nomeadamente a SPME e a SBSE, que se revelaram “amigas do ambiente”, e integradas justamente no conceito da “química verde”, têm mostrado ser uma alternativa credível à

LLE e SPE, principalmente em análise vestigial. A extração sortiva baseia-se num fenómeno de equilíbrio em que o processo de enriquecimento é controlado pelo coeficiente de partição dos compostos entre uma fase polimérica líquida imiscível (fase extratante) e a matriz da amostra. Ao contrário da SPE, em que apenas se considera a área superficial da fase extratante para contacto com a amostra, em extração sortiva todo o volume de fase polimérica encontra-se envolvida no processo de extração. A fase extrativa mais comum nestas técnicas é o polidimetilsiloxano (PDMS), muito conhecido das fases estacionárias usadas nas colunas de GC, sendo termicamente estável e mais inerte que os materiais adsorventes convencionais, possuindo excelentes propriedades de difusão e tolerando uma vasta gama de temperaturas de operação (220-320 °C). Ambas, as técnicas de SPME e SBSE podem ser utilizadas diretamente na matriz da amostra, assim como no espaço de cabeça (HS), podendo ser usadas várias vezes consecutivas sem demonstrar sinais evidentes de deterioração do material polimérico [14] [19] [15].

### 1.7.1. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE é uma técnica de preparação de amostras, inicialmente proposta por Baltussen e colaboradores no final dos anos noventa, para enriquecimento de compostos orgânicos de matrizes aquosas [20]. Uma barra de agitação, constituída por um magnete envolto numa fina película de vidro revestido por um filme em PDMS, conforme é ilustrado na figura 1.2, é colocada na amostra sob agitação, por forma a promover o movimento de rotação na matriz líquida e simultaneamente a extração dos analitos para a camada polimérica em condições experimentais otimizadas.

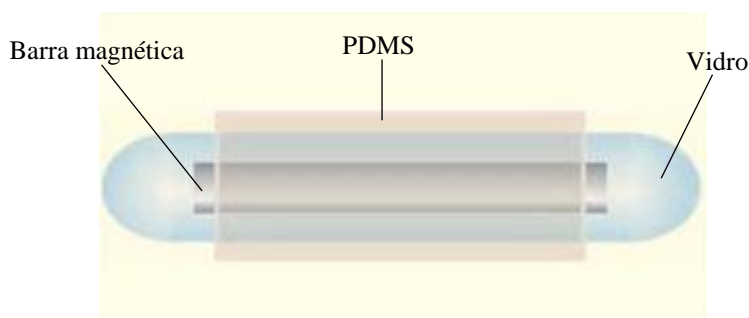


Figura 1.2 - Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE [21].

A película de vidro previne a decomposição do PDMS, que poderia ser catalisado por metais do cilindro metálico, impedindo também a contaminação da amostra com produtos que se poderiam formar.

Em analogia com outras técnicas de extração (ex. SPME), as condições experimentais da SBSE têm de ser otimizadas para cada tipo específico de aplicação.

Para além das características de polaridade dos analitos e da fase de revestimento, a eficiência de recuperação é igualmente influenciada por parâmetros como o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, temperatura, força iónica, pH e características de polaridade do meio, no sentido do analito com interesse atingir o equilíbrio de distribuição entre a matriz da amostra e o revestimento polimérico [22].

A SBSE baseia-se nos mesmos princípios de equilíbrio da SPME. Estudos recentes, demonstraram que existe uma notável correlação entre os coeficientes de distribuição, relativos à distribuição dos analitos entre a fase de PDMS e a matriz aquosa ( $K_{PDMS/W}$ ) e os coeficientes de partição octanol-água ( $K_{O/W}$ ), o qual constitui uma medida da polaridade dos compostos orgânicos e fornece uma boa indicação da eficiência de extração para cada soluto. Ainda que, de uma forma grosseira, os analitos apolares são caracterizados por valores de  $\log K_{O/W}$  superiores a 3,5, apresentando os analitos polares valores inferiores a 2.

O coeficiente  $K_{PDMS/W}$  é por definição a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS ( $C_{PDMS}$ ) e na fase aquosa ( $c_W$ ), após o equilíbrio ser atingido, podendo ser expresso pela equação 1:

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (1)$$

onde  $m_{PDMS}$  é a massa do analito na fase de PDMS,  $m_W$  a massa do analito na fase aquosa,  $V_W$  o volume de amostra aquosa e  $V_{PDMS}$  o volume em PDMS.

Dependendo do  $K_{O/W}$ , os compostos são extraídos em maior ou menor extensão e quanto maior for a quantidade disponível de PDMS, menor é a relação de fase e, consequentemente, mais elevada será a eficiência de extração. Conforme pode ser demonstrado, na SBSE a eficiência de extração dos analitos é genericamente descrita no equilíbrio pelos coeficientes  $K_{O/W}$ , incrementando substancialmente a sensibilidade analítica relativamente à SPME, devido ao maior conteúdo em PDMS envolvido,

permitindo assim diminuir os limites de detecção e proporcionar todas as vantagens analíticas, particularmente em análise vestigial. A figura 1.3 reproduz justamente este comportamento, ilustrando a eficiência obtida por SBSE comparativamente à SPME em função do  $\log K_{O/W}$ , demonstrando que a primeira é bem descrita pelos coeficientes, sendo a recuperação extrativa quantitativamente superior em idênticas condições experimentais. De acordo com a literatura [23, 24], para analitos com valores de  $\log K_{O/W}$  superiores a 3 são normalmente obtidas recuperações quantitativas por SBSE.

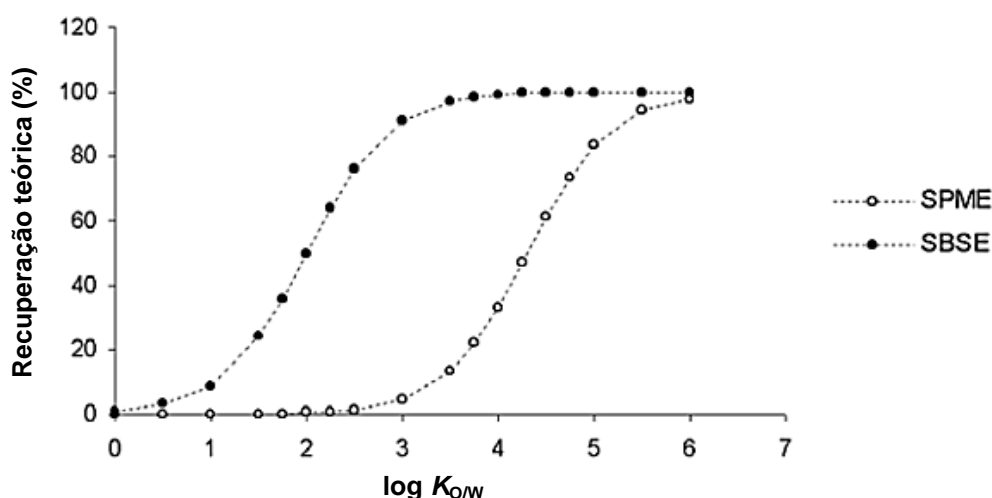


Figura 1.3 - Recuperações teóricas de SPME (PDMS: 0,5  $\mu$ L) e SBSE (PDMS: 50  $\mu$ L) em função do coeficiente de partição de octanol-água em idênticas condições experimentais. Adaptado de [18]

Contrariamente à SPME, para a qual já existem no mercado diversos tipos de revestimentos poliméricos, na SBSE a grande maioria das barras de agitação comercializadas encontram-se revestidas com PDMS contendo um volume compreendido entre 24 e 126  $\mu$ L, apresentando no entanto, uma quantidade substancialmente superior à disponibilizada na fibra de SPME mais comum (0,5  $\mu$ L). A maior relação de fase, entre a matriz da amostra e o PDMS, proporciona desta forma um aumento da capacidade extrativa e, conseqüentemente, sensibilidade da técnica de SBSE para uma ordem de grandeza compreendida entre 50 e 250 vezes, comparativamente à SPME [24, 25].

Uma das principais limitações da SBSE com a fase de PDMS é o facto de responder de forma ineficiente a analitos com  $\log K_{O/W}$  inferior a 3, isto é, compostos

mais polares. Neste sentido, novas estratégias ou novas fases extrativas são requeridas para ultrapassar esta limitação, alargando assim a aplicabilidade da SBSE [26].

### 1.7.2. Micro-extração adsortiva em barra (BA $\mu$ E)

Tendo em conta as limitações do PDMS referidas anteriormente, têm-se efetuado estudos no sentido de desenvolver métodos de extração analítica alternativos. Neste sentido, foi desenvolvido um processo inovador de extração analítica, designado por micro-extração adsortiva em barra (BA $\mu$ E) [27]. Este processo consiste num dispositivo onde se fixa convenientemente os materiais adsorventes (ex. carvões ativados (ACs), zeólitos, polímeros de divinilbenzeno-estireno, etc.) finamente divididos a um suporte adequado, no qual são colocados num vial de extração contendo a amostra (normalmente com 20 a 30 mL) com auxílio de uma barra de agitação magnética de Teflon, mantendo o meio sob agitação convencional. O mecanismo de agitação promove a flutuação da barra até que se atinja o equilíbrio (figura 1.4), apresentando-se vantajoso relativamente ao SBSE.

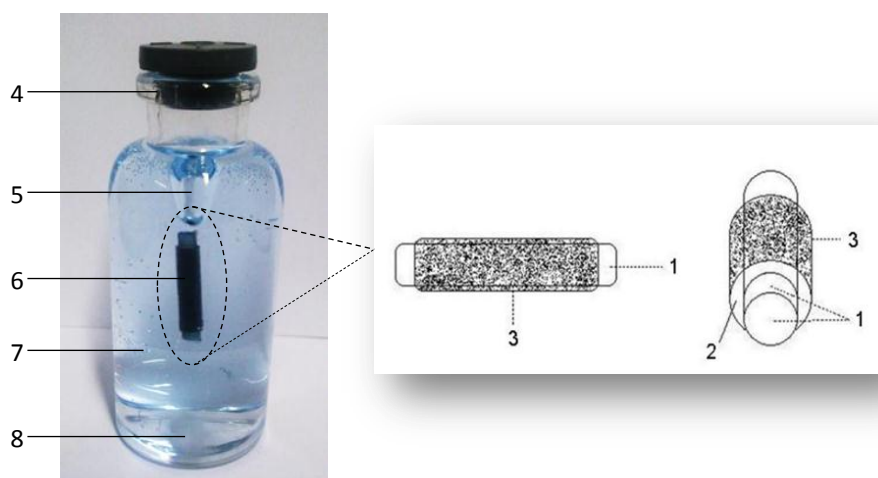


Figura 1.4 - Representações esquemáticas e imagens exemplificativas de BA $\mu$ E. Legenda: 1 – Barra de polipropileno; 2 – Adesivo; 3 – Sorvente; 4 – Vial de extração; 5 – Vórtex; 6 – Dispositivo de micro-extração em barra; 7– Amostra; 8 – Barra de agitação magnética de Teflon. Adaptado de [27]

Os suportes contendo adsorventes adequados, podem ser [27] aplicados a matrizes reais, particularmente a amostras aquosas com origem ambiental ou biológica, no sentido de extrair compostos com interesse para posterior análise com recurso a técnicas cromatográficas, hifenadas e até eletroforese capilar (CE).

No entanto para otimizar a extração é necessário ter em conta parâmetros experimentais como o tempo de equilíbrio entre as fases envolvidas, a velocidade de agitação assim como as características da matriz, nomeadamente o pH, a polaridade e/ou a força iónica, recorrendo-se geralmente a ensaios sistemáticos usando uma estratégia univariante.

Por fim, trabalhos recentes desenvolvidos com recurso a esta tecnologia analítica permitem demonstrar que apresenta excelente desempenho para a extração de uma gama alargada de classes de compostos, desde polares a apolares numa variedade de matrizes aquosas [23, 27-29].

### ***1.8. Técnicas cromatográficas***

As técnicas cromatográficas são essenciais em química analítica na medida em que permitem a separação física de compostos, principalmente de misturas complexas muitas vezes impossíveis de separar por outras operações unitárias.

#### ***1.8.1. Breve nota histórica***

A cromatografia surgiu com o trabalho do botânico russo Mikhail Tswett, o “pai” da cromatografia, que descreveu pela primeira vez em 1906 o processo cromatográfico. O seu trabalho consistiu na separação de pigmentos de plantas, nomeadamente clorofilas e xantófilas por eluição com éter de petróleo numa coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio. As espécies separadas apareciam como bandas coradas na coluna resultando assim o termo “cromatografia”, escolhido para o método; do grego “chroma” que significa cor e “graphein” que significa escrita. Tswett designou por cromatograma a série de bandas que se formavam na coluna cromatográfica quando realizou a separação de pigmentos de plantas [30].

A cromatografia tem sido uma das técnicas que se tem afirmado no último século devido à grande necessidade dos cientistas terem métodos de separação capazes de caracterizar misturas complexas. No entanto, os princípios teóricos da cromatografia só foram estabelecidos entre 1940 e 1950, pela dupla de cientistas Martin e Synge, tendo ambos dado uma contribuição notável para a compreensão dos processos cromatográficos. A teoria dos pratos teóricos proposta foi então reconhecida com a atribuição do prémio Nobel em 1957, que levou à introdução da GC de partição e que



permitiu estabelecer as condições necessárias para o HPLC [31]. Refira-se ainda a contribuição de outros cientistas notáveis com trabalhos absolutamente determinantes no desenvolvimento das técnicas cromatográficas.

Atualmente, as técnicas cromatográficas têm tido um desenvolvimento considerável, dado o carácter repetitivo e a rapidez requeridas em diversos domínios científicos, nomeadamente nas indústrias química, petroquímica, alimentar e farmacêutica, bem como em áreas relacionadas com o ambiente, biologia, química forense, entre outras.

### ***1.8.2. Processo cromatográfico e aspetos teóricos***

Para uma melhor compreensão dos métodos cromatográficos é necessário adquirir uma série de conceitos básicos. Nesta secção, destacar-se-á resumidamente alguns dos aspetos teóricos mais relevantes em cromatografia em coluna.

A cromatografia abrange um conjunto de métodos de separação nos quais os componentes de uma mistura que se pretende separar dissolvem-se numa fase móvel (um gás, líquido ou fluído supercrítico) que atravessa uma fase estacionária imiscível, suportada numa coluna. À medida que a amostra migra através da fase móvel, os seus componentes vão-se separando de acordo com os respetivos coeficientes de distribuição, de modo que os componentes mais fortemente retidos pela fase estacionária se movem de forma mais lenta, enquanto os menos retidos (com maior afinidade para a fase móvel) migram mais rapidamente [32, 33].

As concentrações relativas de um componente na fase estacionária ( $c_s$ ) e na fase móvel ( $c_m$ ) relacionam-se através do coeficiente de distribuição ( $K$ ), dado pela equação (2):

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (2)$$

Quanto maior for o valor de  $c_s$ , maior será o valor de  $K$ , significando que maior será a interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de  $K$  elevado mover-se-ão mais lentamente ao longo da coluna, podendo assim ser separados dos componentes com um valor de  $K$  mais baixo. Uma separação não pode ser efetuada sem haver diferenças na distribuição entre os componentes. A migração diferencial dependerá, portanto, das variáveis experimentais que afetam a distribuição, isto é, das

caraterísticas das fases móvel e estacionária envolvidas, assim como de outros fatores experimentais.

Considerando uma mistura de dois componentes, a separação numa coluna só se efectuará se forem diferencialmente retidos pela fase estacionária, sendo necessários volumes diferentes de fase móvel para eluir cada componente individualmente (figura 1.5).

Um composto não retido será eluído no designado tempo morto ( $t_M$ ), enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção ( $t_R$ ) superior, sendo o tempo de retenção ajustado ( $t_R'$ ) o tempo que o composto despende na fase estacionária.

Uma medida do grau de retenção é designada por fator de capacidade ( $k'$ ) que pode ser calculado a partir da equação (3), desde que a velocidade de fluxo se mantenha constante:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

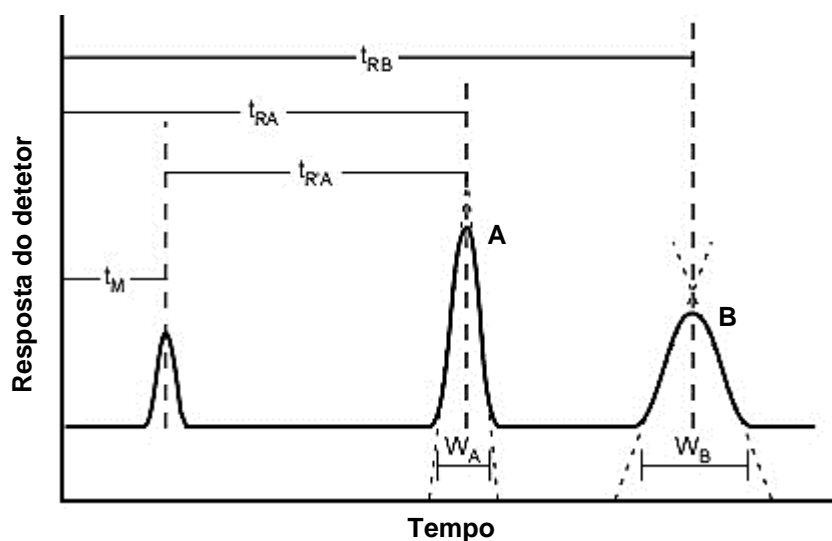


Figura 1.5 - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respetivos parâmetros de retenção. Adaptado de [33]

Por outro lado, a separação de dois compostos adjacentes pode exprimir-se através do fator de separação ou de seletividade ( $\alpha$ ), que está relacionado com a fase estacionária e condições de operação, traduzindo-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes, equação (4):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (4)$$

Refira-se que os parâmetros de retenção se relacionam com a termodinâmica do processo cromatográfico envolvido.

No entanto, sendo a cromatografia um fenómeno igualmente importante de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa através do número de pratos teóricos (N), parâmetro cinético, que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, sendo tanto maior quanto maior for N, e que pode ser calculada pela equação (5):

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (5)$$

em que W é a largura da base de um pico simétrico.

Sendo o objectivo das aplicações cromatográficas a separação de todos os componentes de uma dada mistura, a medida de separação entre dois compostos adjacentes é designada por resolução ( $R_S$ ). Desta forma, pode recorrer-se a uma expressão que exprime a  $R_S$  em termos dos três factores fundamentais, ou seja, seletividade ( $\alpha$ ), fator de capacidade ( $k'$ ) e eficiência (N), como é ilustrado na equação (6) [33-35]:

$$R_S = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k'_B}{(k'_B+1)}\right) \quad (6)$$

Qualquer pico com formato gaussiano apresenta separação completa ou resolução entre eventuais picos adjacentes sempre que  $R_S$  seja igual ou superior a 1,5. Genericamente, as técnicas cromatográficas podem ser classificadas relativamente à natureza física da fase móvel (gás, líquido ou fluido supercrítico), ao suporte da fase estacionária (coluna ou planar), à natureza do mecanismo de distribuição (partição, adsorção, troca iónica, bioafinidade, exclusão molecular e quiral), assim como o tipo de introdução da amostra (eluição, frontal e deslocamento).

### 1.9. Cromatografia em fase gasosa (GC)

O conceito de GC foi introduzido pela primeira vez em 1941 pela dupla Martine Synge, que também foi responsável pelo desenvolvimento da cromatografia de partição [33]. No entanto, foi necessário mais de uma década para demonstrar experimentalmente o potencial da GC, e só em 1955 surgiu no mercado a primeira instrumentação. Desde então, a aplicação da GC tem-se desenvolvido a uma rapidez espantosa, não só em laboratórios científicos de pesquisa, como também em laboratórios analíticos de rotina.

Um sistema de GC é basicamente constituído por um injetor, uma coluna cromatográfica colocada num forno e um detetor, controlados por software adequado. A figura 1.6 ilustra um esquema simplificado dos componentes básicos de um sistema de GC.

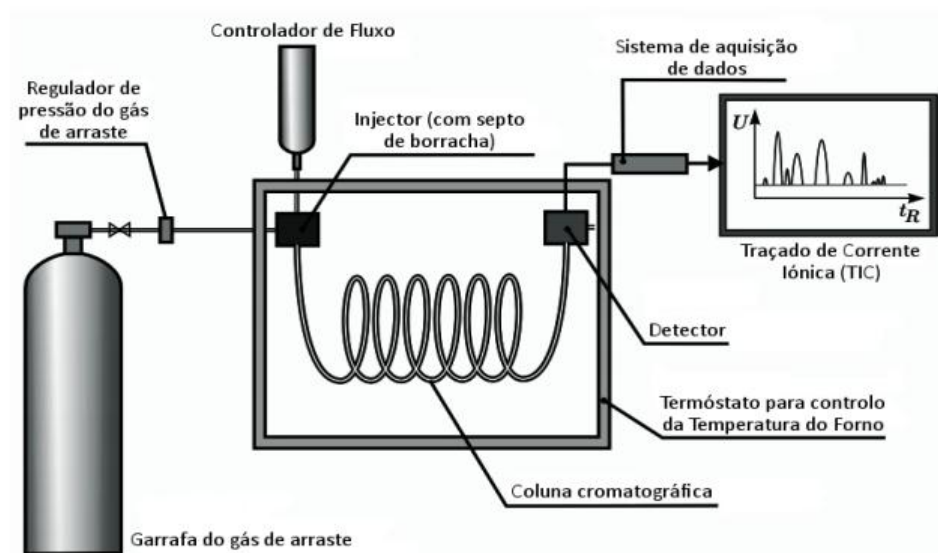


Figura 1.6 - Esquema simplificado de um cromatógrafo em fase gasosa [36].

Existem diversos tipos de sistemas de injeção, sendo que os mais utilizados operam frequentemente por vaporização isotérmica com ou sem repartição de fluxo (“split/splitless”) ou sob vaporização com temperatura programada (PTV). Na injeção no modo “split”, a amostra é imediatamente vaporizada após a introdução no injetor e repartida, entrando uma pequena parte para a coluna, sendo a outra eliminada através de uma válvula. A forma como a amostra é dividida pode ser determinada através da relação entre a quantidade de gás de arraste que deixa o injetor pela válvula de “split” e

o fluxo na coluna (razão de “split”). Na injeção no modo “splitless”, toda a amostra injetada é introduzida na coluna, o que a torna apropriada para análise vestigial de amostras complexas. O modo de injeção PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de injeção de grandes volumes (LVI) de amostra, tornando assim este modo de introdução decisivo em análise vestigial. Enquanto um injetor “split/splitless” opera a temperatura constante, o injetor PTV pode operar com temperatura programada. A amostra é injetada no “liner” frio (normalmente 10-40 °C, abaixo do ponto de ebulição do solvente, sendo o arrefecimento do “liner” efetuado por ar comprimido ou azoto líquido. Durante a injeção e após a eliminação do solvente via “split”, a amostra fica retida no “liner”, sendo o injetor posteriormente aquecido balisticamente e os analitos transferidos para a coluna cromatográfica, onde são separados.

Existem dois tipos de colunas para GC, nomeadamente, as colunas de empacotamento e as colunas capilares, sendo as últimas atualmente mais utilizadas devido à elevada eficiência, que oferecem para resolver a maioria das amostras. As colunas capilares são constituídas por um tubo de sílica fundida, com revestimento exterior em poliimida e a fase estacionária a revestir a parede interna. As fases estacionárias mais comuns são constituídas à base de polisiloxano, em que o tipo e a percentagem de grupos substituintes diferenciam cada fase e ditam as características de polaridade, sendo o (PDMS), com características apolares, o revestimento mais vulgarmente usado. As colunas capilares disponíveis comercialmente têm cerca de 5 a 100 m em comprimento, com diâmetros internos compreendidos entre 0,1 e 0,75 mm. Para operação, a coluna encontra-se localizada num forno adequado, podendo operar no modo isotérmico ou com gradiente de temperatura.

Um detetor ideal deve ser sensível, seletivo, estável, reproduzível e dar resposta linear numa gama alargada de concentrações para os analitos em estudo. Atualmente existem uma alargada variedade de detetores para GC, conforme as necessidades de aplicação pretendidas, dos quais se destacam o detetor de ionização de chama (FID), de condutividade térmica (TCD), de captura eletrónica (ECD) e de azoto-fósforo (NPD). A GC pode ainda ser associada a outras técnicas analíticas, assumindo especial relevo a espectrometria de massa (MS), com vantagens acrescidas em termos da identificação espectral, sensibilidade e seletividade. O acoplamento permite a associação em série de duas poderosas técnicas analíticas [33, 35, 37].

### 1.9.1. Cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é uma das técnicas hífenadas mais utilizadas quer em estudos qualitativos quer quantitativos de compostos presentes numa grande diversidade de matrizes.

Neste sistema, a amostra é introduzida no injetor de um cromatógrafo em fase gasosa, que após a separação dos constituintes na coluna, os compostos eluídos entram na câmara de ionização onde são bombardeados por um feixe de eletrões, ocorrendo a sua ionização e posterior fragmentação. O conjunto de iões previamente formados é desviado e acelerado, na direção do analisador de massa, por ação de um campo elétrico onde são separados de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ). Os analisadores de massa mais comuns são a armadilha de iões (“ion trap”), quadrupólo e tempo de voo. Os iões separados são transferidos para o detetor, genericamente um multiplicador de eletrões que apresenta um tempo de resposta rápido (da ordem dos nanosegundos), capaz de adquirir elevadas correntes, utilizando uma tensão de aceleração a fim de transformar a corrente iónica numa corrente eletrónica suscetível de ser medida, originando um gráfico (espectro) da abundância em função da  $m/z$ .

A grande vantagem da utilização do acoplamento GC-MS (figura 1.7) reside na sua capacidade em responder a todos os compostos orgânicos voláteis e semivoláteis. Quando opera no modo de varrimento contínuo (“full-scan”) permite a identificação de compostos em amostras desconhecidas com recurso a bibliotecas espectrais de referência (ex. NIST, Wiley, etc.). Quando o objetivo reside na quantificação vestigial de compostos alvo, o modo de monitorização de iões selecionados (SIM), permite elevada sensibilidade e seletividade, tornando-se numa ferramenta analítica muito poderosa [37].

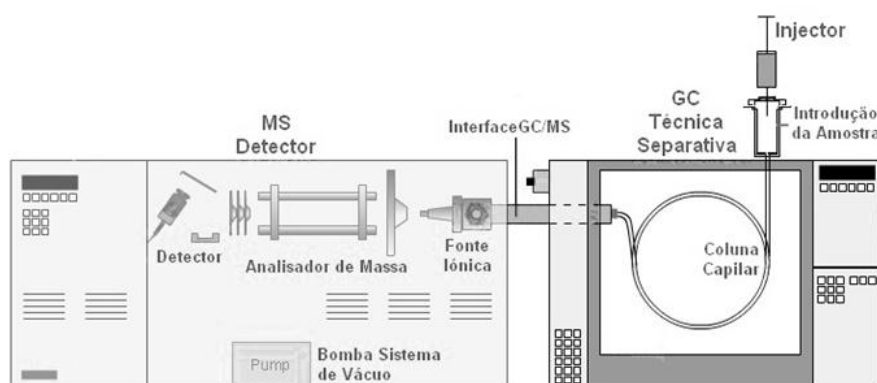


Figura 1.7 - Esquema de um sistema de GC-MS [38]

### **1.10. Objetivos**

A presente dissertação tem como principal objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para a determinação vestigial de agroquímicos em matrizes aquosas, tendo por base a técnica de micro-extração adsortiva em barra seguida de dessorção líquida e análise por injeção de grandes volumes-cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (BA $\mu$ E-LD/LVI-GC-MS).

Neste sentido, foram traçados os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliação e seleção do material adsortivo (ACs ou polímeros) para a extração seletiva dos agroquímicos com interesse (alacolor, diniconazol, fenpropatrina e os isómeros *cis/trans*-permetrina);
- ✓ Otimização da metodologia segundo vários parâmetros com interesse como velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, pH, modificador orgânico, força iônica e ainda tipo de solvente e tempo de dessorção.
- ✓ Validação da metodologia desenvolvida;
- ✓ Aplicação do método analítico a matrizes de água superficial, subterrânea e de amostras de vinho;
- ✓ Comparação do desempenho da metodologia desenvolvida com outras técnicas vigentes (SPME, SBSE, etc).





## *2. Parte experimental*

---



## **2.1. Reagentes químicos, padrões analíticos, materiais sorventes e amostras**

### Reagentes químicos e padrões analíticos

Os reagentes e solventes utilizados eram analiticamente certificados. O metanol (MeOH, 99,8 %) e o acetonitrilo (ACN, 99,8 %) de qualidade HPLC foram obtidos pela Fisher Scientific (Inglaterra). O cloreto de sódio (NaCl, 99,9 %) foi adquirido da Merk (Alemanha), o hidróxido de sódio (NaOH, 98,0 %) foi obtido da AnalaR (BDH Chemicals, Inglaterra) e o ácido clorídrico (HCl, 34-37 %) foi fornecido pela Panreac (Espanha). O Alacloro (ALA, 99,7 %), o diniconazol (DIN, 99,1 %), a fenpropatrina (FEN, 98,1 %) e os isómeros *cis* e *trans* da permetrina (*cis/trans*-PERM, 94,4 %) foram obtidos pela Riedel-de-Haën (Alemanha). A água ultra-pura utilizada no estudo foi obtida através de um sistema de purificação de água Mili-Q (Milipore, EUA).

### Materiais sorventes

Os ACs comerciais em pó, CA1 (AC1; área superficial: 1400 m<sup>2</sup>/g; pH<sub>pzc</sub>: 2,2), CN1 (AC2; área superficial: 1400 m<sup>2</sup>/g; pH<sub>pzc</sub>: 6,4), SX1 (AC3; área superficial: 900 m<sup>2</sup>/g; pH<sub>pzc</sub>: 8,4), foram fornecidos pela Cabot Norit (Texas, EUA.) e cedidos pela Salmon & Cia. Lda. (Portugal). O polímero de estireno divinilbenzeno (PS-DVB) Strata® SDBL (P1; tamanho de partícula: 100 µm; tamanho dos poros: 260 Å; área superficial: 500 m<sup>2</sup>/g; estabilidade de pH: 1-14) foi fornecido pela Phenomenex (Torrance, CA, EUA.).

### Amostras

As amostras reais estudadas ao longo deste trabalho foram águas superficiais, águas subterrâneas e vinho. As amostras de água foram recolhidas do rio Alviela e de um poço da zona de Santarém. A amostra de vinho foi cedida de um produtor da região de Santarém. As amostras antes de serem estudadas foram filtradas (filtro Whatman No. 1). Todas as amostras foram armazenadas no frigorífico (4° C) até serem analisadas.

## **2.2. Materiais e equipamentos**

Para além do material corrente de laboratório foram utilizadas microseringas de alta precisão com êmbolo flexível e capacidade de 10, 50, 100, 500  $\mu\text{L}$  (Hamilton, EUA), barras de agitação de “Teflon”  $12 \times 3,0$  mm, (VWR International, EUA), frascos de vidro de 25 mL (Macherey – Nagel, Alemanha) com as respetivas tampas ( $d = 20$  mm), *inserts* de vidro de fundo plano de 0,2 mL ( $6 \times 31$  mm, VWR International, EUA), vials de vidro transparentes de 1,5 mL ( $11,6 \times 32$  mm, VWR Internacional, Portugal), com as respetivas tampas (diâmetro = 11 mm) para o amostrador automático do GC e encapsulador manual (diâmetro = 11 mm, Agilent Technologies, EUA).

As pesagens foram efetuadas em balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça). Utilizou-se ainda um banho de ultrassons equipado com termóstato (Branson ® 3510 E-DTH, EUA), um vortex (Velp, Itália) e uma placa de agitação múltipla com quinze posições para amostras (Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 15, Alemanha). O pH das amostras foi controlado com recurso ao sistema Metrohn 744 pH Meter contendo um eléctrodo combinado de vidro (Suíça).

As análises por GC-MS foram efetuadas no sistema Agilent Technologies (Alemanha), constituído por um cromatografo em fase gasosa (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV), acoplado ao detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). Todos os dados registados e o controlo instrumental foram efectuados a partir do software MSD ChemStation (G1701; versão C.00.00; Agilent Technologis, Alemanha). A coluna capilar utilizada foi a TRB-5MS  $30,0$  m  $\times$   $0,25$  mm,  $0,25$   $\mu\text{m}$ ; 5% fenil, 95 % PDMS (Tecnokroma, Espanha).

## **2.3. Método experimental**

### **2.3.1. Preparação das soluções padrão**

A solução mãe de cada padrão em estudo foi preparada individualmente em ACN com concentração de  $1000$  mg  $\text{L}^{-1}$ . A partir da solução mãe foi preparada semanalmente uma solução mistura dos analitos em estudo com uma concentração de  $100$  mg  $\text{L}^{-1}$ . As soluções de trabalho e de calibração instrumental foram preparadas diariamente a partir da diluição adequada da solução mistura de  $100$  mg  $\text{L}^{-1}$ .

### **2.3.2. Condições instrumentais**

Para o estudo dos parâmetros instrumentais por GC-MS, o ALA, o DIN, a FEN e os isômeros *cis/trans*-PERM foram analisados individualmente para obter os parâmetros de retenção e os espectros de massa correspondentes.

O injetor PTV foi arrefecido com azoto líquido no modo de injeção “solvent vent” (tempo de “vent”: 0,30 min; 50 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 0,0 psi; fluxo de purga: 60,0 mL min<sup>-1</sup>, tempo 2 min), tendo a temperatura sido programada desde 60 °C (0,35 min) até 320 °C (600 °C min<sup>-1</sup>, 3 min isotérmica) e subsequentemente para 200 °C (50 °C min<sup>-1</sup> até ao final da análise). O volume e a velocidade de injeção foi 20 µL e 100 µL min<sup>-1</sup>, respetivamente. A fase móvel utilizada foi hélio mantido no modo de pressão constante (9,82 psi). A temperatura do forno foi programada desde 100 °C (1 min) até 290 °C (1 min) (15 °C min<sup>-1</sup>) com tempo de corrida de 18,67 minutos.

A temperatura da linha de transferência, fonte de ionização e o quadrupólo foram mantidos a 280, 230 e 150 °C respetivamente, tendo sido selecionado um “solvent delay” de 8 min. Foi usada ionização eletrónica (70 eV) numa gama de massa compreendida entre 35 e 550 Da, no modo de varrimento contínuo (“full-scan”), com corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1200 V.

No modo SIM, vários grupos de iões alvo foram monitorizados numa janela de tempo definida pela retenção correspondente, mantendo o “dwell time” em 100 ms.

### **2.3.3. Calibração instrumental**

Para a identificação, os quatro analitos foram analisados individualmente para se obter os respetivos parâmetros de retenção e espectros de massa. A partir das soluções de padrões individuais preparou-se uma solução mistura dos quatro analitos com a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Através de sucessivas diluições desta solução mistura, obtiveram-se os padrões que foram injetados no sistema cromatográfico, por forma a determinar os limites de deteção (LODs) e de quantificação (LOQs) instrumentais, que correspondem a uma razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e 10/1, respetivamente.

Para o estudo da linearidade e construção das respetivas curvas de calibração, prepararam-se soluções com dez níveis de concentração (2, 4, 8, 16, 32, 63, 125, 250, 500 e 1000 µg L<sup>-1</sup>), a partir de uma solução mistura dos quatro analitos (10,0 mg L<sup>-1</sup>). Todos os estudos foram efetuados em triplicado.

#### **2.3.4. Preparação dos dispositivos de BAμE**

O dispositivo em barra consiste num suporte cilíndrico em polipropileno com comprimento de 15 mm e 3 mm em diâmetro, revestido externamente com adesivo. O dispositivo previamente revestido foi coberto com adsorventes (ACs ou polímeros), ficando desta forma suportado.

Antes da utilização, o dispositivo foi previamente condicionado em água ultra-pura sob agitação durante 10 minutos para retirar o excesso de material sólido, tendo sido repetido este procedimento duas vezes.

#### **2.3.5. Ensaios de otimização e validação**

No desenvolvimento da otimização e validação foram efetuados ensaios de extração medindo 25 mL de água ultra pura para um frasco de vidro apropriado, colocando-se de seguida a barra de agitação e o dispositivo de micro-extração com o adsorvente selecionado. Posteriormente, os frascos contendo as soluções aquosas foram então fortificados com 200,0 μL da solução padrão mistura de modo a obter uma concentração final de 2,0 μg L<sup>-1</sup>, sendo por fim o frasco fechado. A agitação foi promovida através da agitação da barra magnética durante um determinado período de tempo à temperatura ambiente. Após a extração, o dispositivo de micro-extração foi retirado e seco num papel limpo com o auxílio de uma pinça, sendo em seguida transferido para um vial contendo um *insert* de vidro onde foi colocado juntamente com 200,0 μL de solvente orgânico para se proceder à retro-extração através de tratamento ultrassónico durante um período de tempo. De seguida, o dispositivo de micro-extração foi retirado e o vial selado com auxílio de um encapsulador. Por fim, colocou-se o vial no amostrador automático para posterior análise por GC-MS.

Por forma a otimizar a eficiência da extração, estudaram-se diversos parâmetros em triplicado, nomeadamente, o solvente (MeOH, ACN, MeOH/ACN 50% (v/v)) e o tempo de dessorção (15, 30 e 45 min), assim como a velocidade de agitação (750, 1000 e 1250 rpm), tempo de extração (1, 2, 3, 4 e 16 h), pH (2,0; 5,5; 8,0 e 11,0), modificador orgânico (0, 5, 10 e 15 % em MeOH, v/v) e força iónica (0, 5, 10 e 15 % em NaCl, m/v) da matriz.

Para os estudos de validação do método, efetuaram-se ensaios com diferentes níveis de fortificação (0,03 – 4,0 μg L<sup>-1</sup>), seguindo-se o procedimento anteriormente

descrito em condições otimizadas. Para os cálculos das recuperações (anexo V), foi feita a comparação das áreas dos picos obtidas em cada ensaio com as dos picos das áreas dos padrões de controle.

#### **2.3.6. Ensaio de aplicação a amostras reais**

Para demonstrar a capacidade analítica da metodologia desenvolvida, realizaram-se diversos ensaios em matrizes reais. Neste sentido, amostras de água superficial, subterrânea e vinho foram estudadas. Após a recolha das amostras de água e vinho, recorreu-se ao método da adição de padrão (SAM) para quantificação dos agroquímicos em estudo (ALA, DIN, FEN, isómeros *cis/trans*-PERM) nas amostras reais.

Em cada ensaio, 25 mL de amostra foram colocados num frasco de vidro e fortificados com 200,0 µL da solução padrão mistura para a concentração desejada (0,2 – 2,0 µg L<sup>-1</sup>), seguindo-se o procedimento descrito anteriormente sob condições experimentais otimizadas. Ensaio em branco foram igualmente realizados com as amostras reais utilizando o procedimento descrito, sem fortificação.





### ***3. Discussão de resultados***

---



### 3.1. Otimização instrumental

Numa abordagem inicial ao trabalho procedeu-se à determinação das melhores condições instrumentais para análise de cinco agroquímicos modelo (ALA, DIN, FEN e *cis/trans*-PERM) selecionados para o presente estudo, uma vez serem amplamente usados nas práticas agrícolas na EU. A figura 3.1 e a tabela 3.1 fornecem informações da estrutura química bem como do tipo de agroquímicos envolvidos, respetivamente.

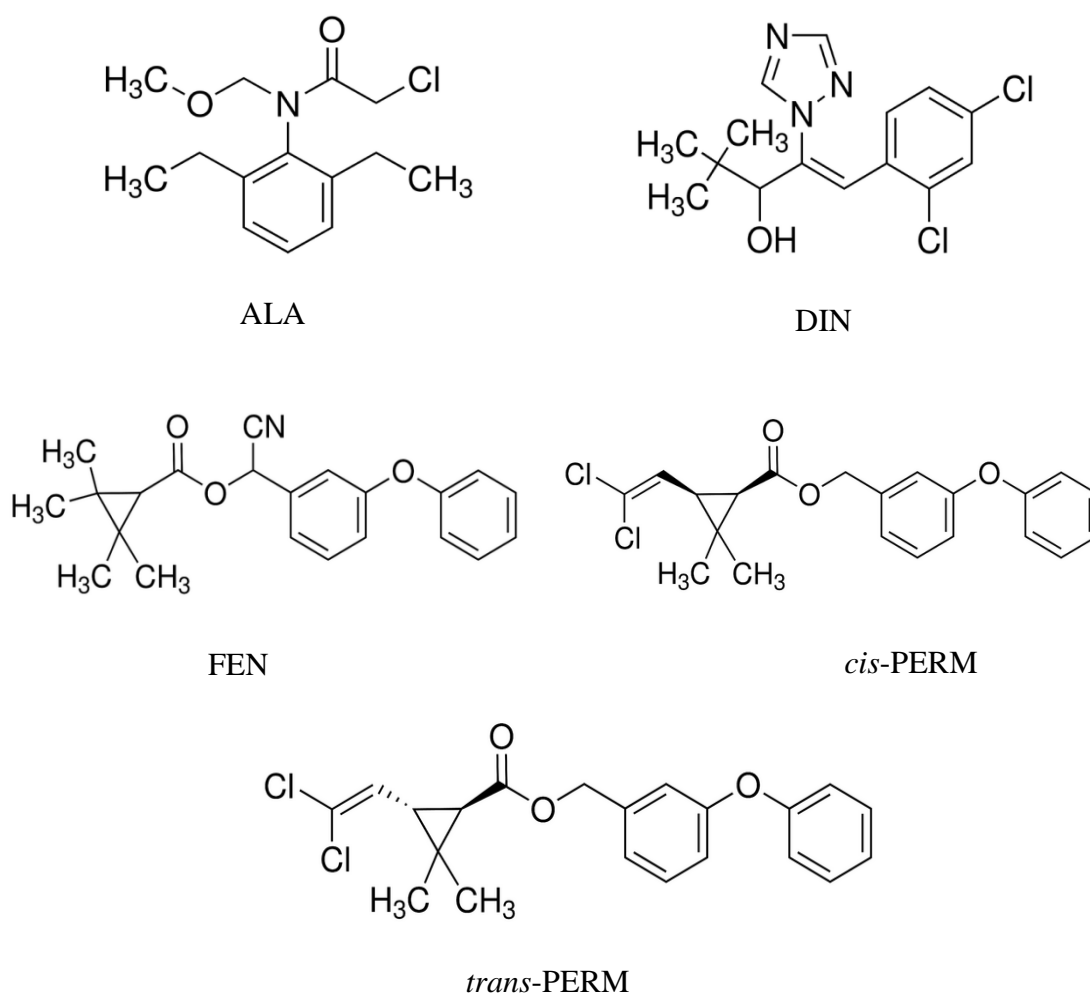


Figura 3.1 - Estruturas químicas dos agroquímicos em estudo.[39]

Os agroquímicos estudados e respetiva classificação pelo modo de ação e classe química são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Classificação dos agroquímicos em estudo de acordo com o modo de ação e classe química.

Agroquímicos	Modo de acção	Classe química
ALA	Herbicida	Cloroacetanilida
DIN	Fungicida	Azol
FEN	Inseticida	Piretróide
<i>cis/trans</i> -PERM	Inseticida	Piretróide

Porém, os parâmetros fundamentais para se proceder à análise adequada destes compostos são o tempo de retenção ( $t_R$ ) e o espectro de massa característico de cada composto.

Neste sentido, uma solução mistura contendo os cinco compostos em estudo ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi analisada por GC-MS, tendo a análise ocorrido em menos de 19 min, conforme se observa no cromatograma reproduzido na figura 3.2. Por outro lado, o espectro de massa característico de cada composto, obtido no modo “full-scan” (Anexo I), permitiu seleccionar iões alvo (pico base) e principais fragmentos, no sentido de se alcançar melhor seletividade e sensibilidade para operação no modo SIM. Os dados cromatográficos e espectrais encontram-se resumidos na tabela 3.2, e estão de acordo com os estudos prévios indicados na literatura [12, 13, 40, 41].

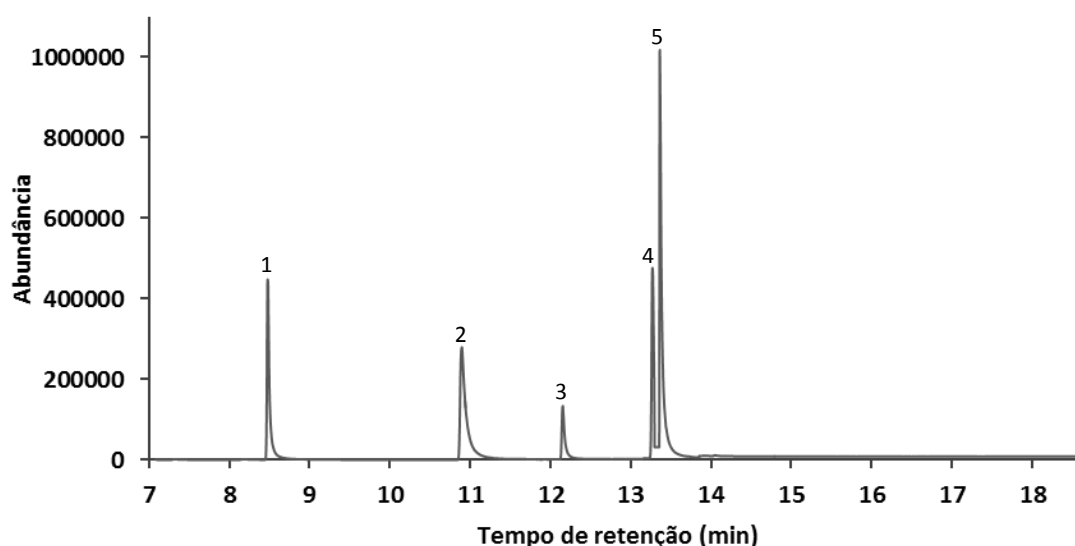


Figura 3.2 - Cromatograma obtido por LVI-GC-MS(SIM) relativo aos agroquímicos estudados ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) em condições instrumentais otimizadas. (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM).

Tabela 3.2 -  $\log K_{O/W}$ , tempo de retenção ( $t_R$ ) e iões selecionados para quantificação no modo SIM para os agroquímicos em estudo.

Agroquímicos	$\log K_{O/W}$	$t_R$ (min)	Iões SIM ( $m/z$ ) *
ALA	3,52	8,52	<u>160</u> , 188, 237
DIN	4,30	10,93	232, <u>268</u> , 270,
FEN	5,70	12,20	<u>97</u> , 181, 265
<i>cis</i> -PERM	6,50	13,32	163, 165, <u>183</u> ,
<i>trans</i> -PERM	6,50	13,42	163, 165, <u>183</u> ,

\*Ião sublinhado usado para quantificação

De modo a determinar a precisão instrumental, injetou-se em triplicado uma mistura padrão ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) dos cinco compostos estudados, tendo-se procedido à análise por GC-MS. A precisão analisada respeitante ao desvio padrão relativo (RSD) das áreas dos cinco compostos estudados permitiu obter valores inferiores a 16,0 %.

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram igualmente obtidos a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) inicial até se obter uma razão S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. A linearidade instrumental foi estabelecida usando-se soluções padrão com dez níveis de concentração, compreendidas entre 2,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e analisados em triplicado. A aplicação do método dos mínimos quadrados aos dados obtidos permitiu obter as calibrações reproduzidas no anexo III, tendo os coeficientes de determinação sido superiores a 0,9972. A tabela 3.3 fornece informação relativa às curvas de calibração instrumental assim como os parâmetros instrumentais obtidos, respetivamente.

Tabela 3.3 - Tempos de retenção ( $t_R$ ), limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama linear e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) dos cinco agroquímicos obtidos por LVI-GC-MS(SIM) em condições instrumentais optimizadas.

Agroquímicos	$t_R$ (min)	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Gama Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$r^2$
ALA	8,52	4,0	13,2	16,0 – 1000,0	0,9972
DIN	10,93	0,5	1,7	2,0 – 1000,0	0,9988
FEN	12,20	5,0	16,5	32,0 – 1000,0	0,9978
<i>cis</i> -PERM	13,32	0,5	1,7	2,0 – 1000,0	0,9973
<i>trans</i> -PERM	13,42	0,3	0,8	2,0 – 1000,0	0,9975

### **3.2. Seleção do material sorvente**

Depois de estabelecidos os parâmetros instrumentais, seguiu-se a seleção da fase extrativa mais seletiva aos cinco agroquímicos em estudo. Neste sentido, selecionaram-se diversos materiais, nomeadamente, três ACs e um polímero, de forma a poder demonstrar a eficiência de extração dos sorventes envolvidos. Como tal, vários ensaios foram realizados em triplicado para cada fase extrativa estabelecendo-se inicialmente condições experimentais padrão (extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN, 200  $\mu$ L, 30 min sob tratamento ultrassónico) de acordo com trabalhos prévios [42-44].

Para uma melhor compreensão desta temática relativa aos sorventes envolvidos neste estudo deve-se-á ter em conta que os ACs são materiais sólidos porosos que retêm os solutos através de interações eletrostáticas e/ou dispersivas que podem ser condicionadas pelo pH do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ) dos sorventes envolvidos [45]. As propriedades adsorptivas das nanoestruturas envolvidas, que incluem a área superficial, tamanho de partícula e dimensão do poro, são de igual modo fatores determinantes para o processo de micro-extração. Por outro lado, os materiais poliméricos atuam através de interações do tipo fase reversa [28], retendo os analitos com recurso a ligações  $\pi$ - $\pi$ , pontes de hidrogénio, interações dipolo-dipolo, hidrofóbicas e/ou iónicas, podendo as propriedades adsorptivas destes sorventes influenciar igualmente também o processo de micro-extração envolvido [15].

A figura 3.3 mostra as recuperações médias obtidas para os diferentes sorventes testados sob condições experimentais padrão. Dos resultados apresentados o polímero P1 foi o que demonstrou melhor recuperação comparativamente com os ACs (AC1, AC2 e AC3), alcançando recuperações médias compreendidas entre 35 e 84% para os analitos em estudo. Isto deve-se ao polímero P1 apresentar interações do tipo fase reversa fortes retendo os analitos seletivamente através de interações hidrofóbicas e ligações  $\pi$ - $\pi$  do anel benzénico da matriz polimérica P1 com os anéis benzénicos e/ou triazínicos dos agroquímicos em estudo. Por outro lado, P1 é um polímero que apresenta estabilidade ao longo de toda a gama de pH permitindo aos compostos analisados apresentarem neutralidade com os valores empregues nos ensaios

Relativamente às fases sorventes relativas aos ACs, a melhor recuperação média dos compostos envolvidos foi para o AC2, compreendida entre 24 e 64%. Este resultado deve-se principalmente às propriedades intrínsecas deste material sorvente no qual

apresenta um  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  próximo do valor de pH empregue nestes ensaios, assim como à elevada área superficial. Ou seja, para o valor de pH 5,5 a área superficial deste material encontra-se com uma razão de cargas positivas e negativas praticamente similares, favorecendo interações eletroestáticas e/ou dispersivas com os compostos em estudo. Quanto aos carvões AC1 e AC3 estes apresentam diferentes áreas superficiais, encontrando-se parcialmente carregados negativamente ou positivamente para o valor de pH dos ensaios (5,5), dificultando neste caso, as interações eletroestáticas e/ou dispersivas com os compostos em estudo [28].

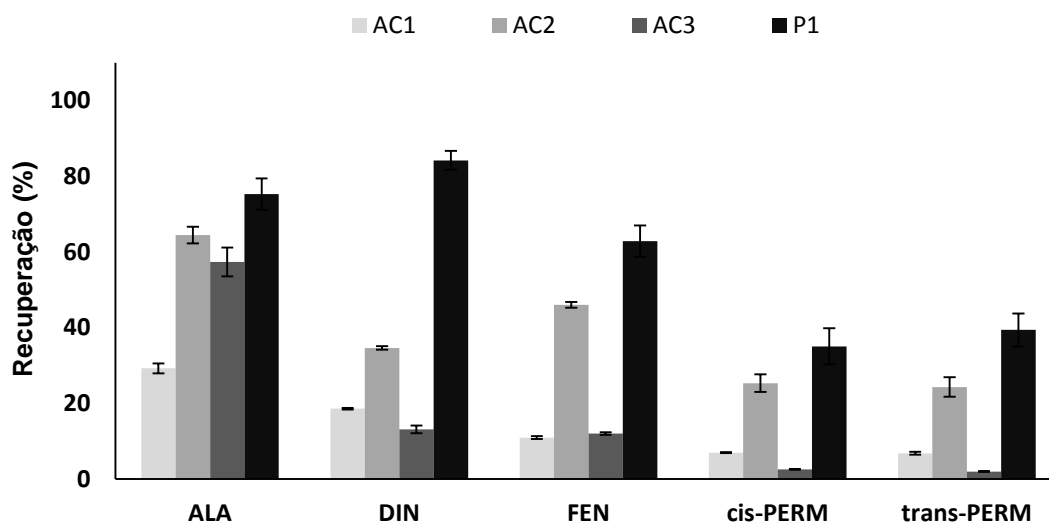


Figura 3.3 - Efeito das diferentes fases sorventes usando AC1, AC2, AC3 e P1 na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

Deste modo, a fase selecionada para o presente trabalho foi o polímero P1, uma vez os resultados preliminares terem demonstrado melhores recuperações do que os restantes sorventes para os compostos agroquímicos em estudo.

### 3.3. Otimização da retro-extração (LD)

O processo de retro-extração é um passo muito importante, uma vez ter como função a remoção completa dos compostos alvo da fase extrativa para uma fase orgânica líquida. Para esse fim, os parâmetros tidos em conta na otimização do passo da

dessorção líquida (LD) foram o tipo de solvente usado e o tempo de dessorção envolvido. [28].

### *3.3.1. Efeito do tipo de solvente*

O tipo de solvente na retro-extração tem uma importância fundamental, uma vez ter de garantir a capacidade para remover os analitos por quebra das interações que sustentam a adsorção aos sorventes. Este processo pode ainda ser acelerado com o auxílio de tratamento ultrasónico.

Deste modo, para analisar qual o melhor solvente para retro-extração testaram-se três tipos de solventes convencionais, nomeadamente MeOH, ACN e a mistura MeOH:ACN (50:50, v:v). Os resultados alcançados encontram-se reproduzidos na figura 3.4, tendo sido obtidos após extração em condições experimentais padrão (descritas no gráfico). Por observação dos resultados, verifica-se que a capacidade de retro-extração do ACN é claramente superior para todos os analitos em estudo comparativamente com os dois outros solventes testados. Neste sentido, o ACN foi selecionado como solvente para retro-extração nos ensaios posteriores.

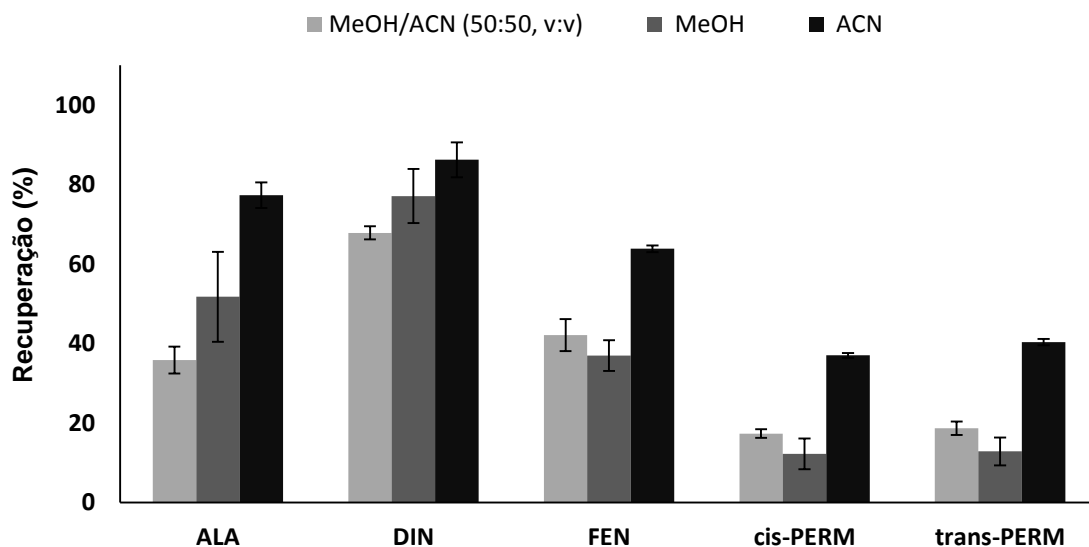


Figura 3.4 - Efeito do solvente de retro-extração na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrasónico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).



### 3.3.2. Efeito do tempo de dessorção

O tempo de dessorção é um factor igualmente importante para garantir que a transferência dos analitos do adsorvente para o solvente seja completa, evitando assim a ocorrência de efeitos de memória. No presente estudo, efetuaram-se ensaios de LD durante 15, 30 e 45 minutos com recurso a tratamento ultrassónico.

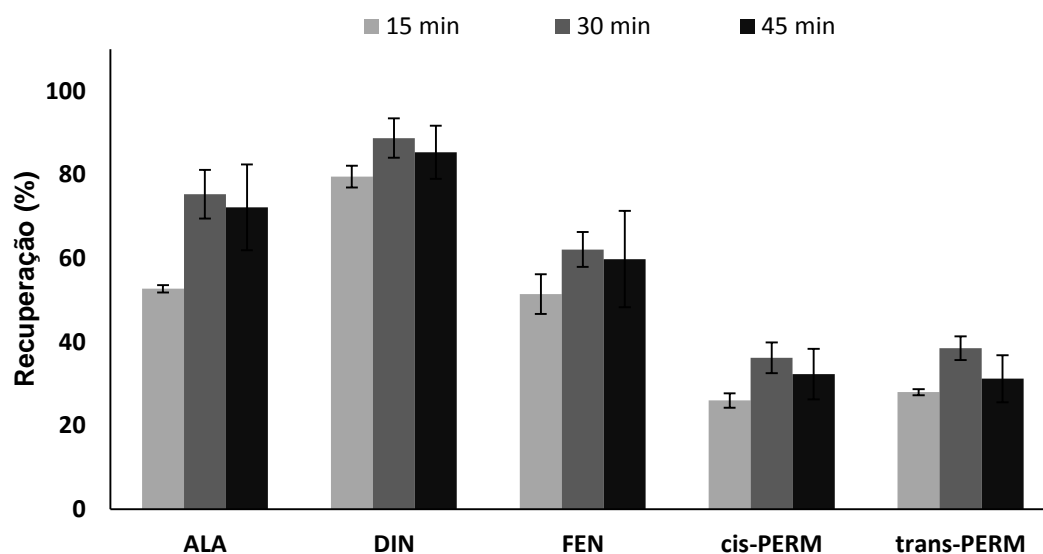


Figura 3.5 - Efeito do tempo de retro-extração na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ ; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

Por observação da figura 3.5 verifica-se que 30 minutos de retro-extração usando ACN eram suficientes para a dessorção completa dos analitos, uma vez que, períodos de 15 e 45 min apresentarem recuperações mais baixas para os analitos em estudo. Tal facto, poder-se-á justificar por o tempo de 15 minutos de retro-extração não ser suficiente para quebrar a maioria das interações entre os compostos e o sorvente, o que dificulta a transferência dos analitos na totalidade para a fase orgânica. Por outro lado, 45 min sob tratamento ultrassónico aumenta ligeiramente a temperatura dos vials, podendo levar à degradação do dispositivo e originar menores recuperações [27]. Consequentemente, o tempo de dessorção seleccionado para prosseguir os estudos foi de 30 minutos.

### **3.4. Otimização BAμE(P1)**

Após otimizados os parâmetros relativos à retro-extração, prosseguiu-se com a otimização dos principais parâmetros do processo de micro-extração, nomeadamente, velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, pH, modificador orgânico e força iónica da matriz aquosa.

#### **3.4.1. Efeito da velocidade de agitação**

A velocidade de agitação é um parâmetro que influencia a eficiência da BAμE, na medida em que controla a distribuição dos analitos da fase aquosa para a fase polimérica condicionada pela tecnologia de amostragem por flutuação. Porém, quanto maior for a velocidade de agitação, maior será a rapidez para se alcançar a cinética de equilíbrio entre as duas fases, isto é, transferência de massa dos analitos da matriz aquosa para o adsorvente. No entanto, em certos casos pode ser prejudicial, já que velocidades muito elevadas pudessem ter um efeito nulo ou negativo na micro-extração, devido a uma agitação menos reprodutível [14, 19].

Para averiguar o efeito da velocidade de agitação na presente metodologia, testaram-se as velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm. Analisando a figura 3.6, verifica-se que o ALA e o DIN apresentaram melhores eficiências de extração para velocidades de 1250 rpm. No entanto, como para o FEN e *cis/trans*-PERM a velocidade de 1250 rpm não influenciou na recuperação destes analitos, a velocidade de 1000 rpm foi a que obteve maior eficiência de extração, tendo sido a velocidade escolhida para os ensaios seguintes.

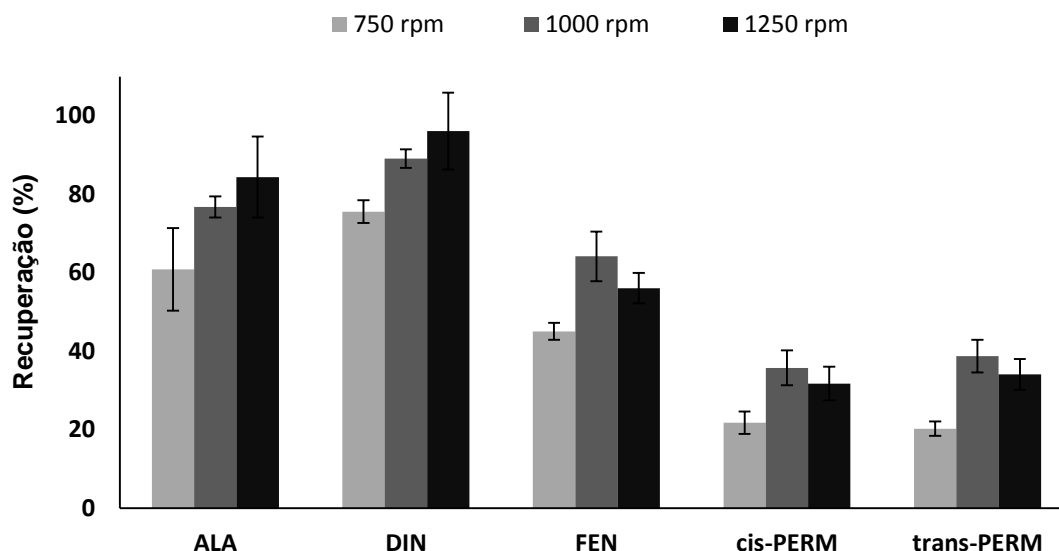


Figura 3.6 - Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 3 h, pH 5,5; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

### 3.4.2. Efeito do tempo de equilíbrio

Um dos parâmetros de grande relevância que também pode afetar a eficiência da extração é o tempo de equilíbrio, uma vez que, determina a duração necessária para que cada analito seja quantitativamente transferido da amostra aquosa para o sorvente, sendo um dos parâmetros mais importantes na otimização do método de BA $\mu$ E. Este parâmetro afeta a cinética de transferência entre a fase aquosa da amostra e a fase sorvente, uma vez que, os compostos que apresentam coeficientes de difusão reduzidos necessitam de maior tempo para atingir o equilíbrio [14, 19]. É um parâmetro igualmente condicionado pela tecnologia de amostragem por flutuação.

Por forma a estudar esta variável, realizaram-se extrações durante 1, 2, 3, 4 e 16 horas. Por observação da figura 3.7 verifica-se que as extrações de 4 e 16 horas foram as que apresentaram melhor desempenho em todos os analitos em estudo. Contudo, optou-se por selecionar um período de 4 horas para o restante trabalho, uma vez, (i) a diferença das percentagens de recuperação de ambas serem significativamente semelhantes; (ii) o RSD ser maior para a recuperação dos analitos com a extração de 16 horas; (iii) as recuperações não justificarem um tempo analítico superior a 4 horas, de modo a compensar o consumo de tempo de extração e recursos, já que a cinética sugere

não ser lenta. Esta constatação parece, no entanto, ser mais evidente para ALA, DIN e FEN.

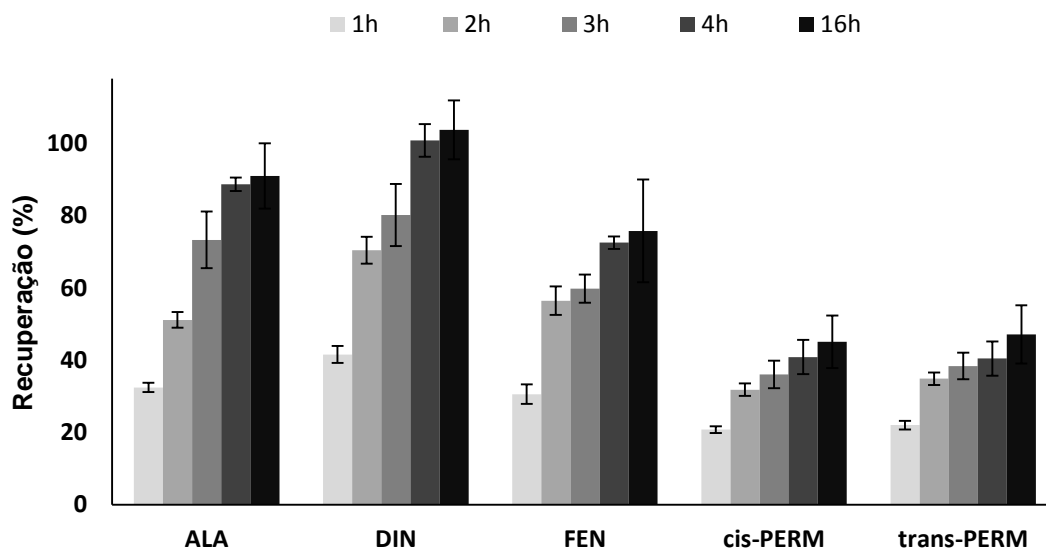


Figura 3.7 - Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; 1000 rpm, pH 5,5; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

### 3.4.3. Efeito do pH

O controlo do pH da matriz permite a ionização dos analitos e modificação das condições da amostra, podendo influenciar o equilíbrio estabelecido [14, 19]. Neste sentido, foram testados vários valores de pH (2, 5,5, 8 e 11), por forma a determinar qual terá maior influência na recuperação dos analitos em questão.

Os resultados obtidos e reproduzidos na figura 3.8 mostram que o pH da matriz estudada não influencia significativamente a recuperação destes compostos, à exceção do FEN onde é demonstrado que para valores de pH do meio mais elevados a recuperação diminui uma vez o composto ser ionizado ( $pK_a$  10,60) [46] (Anexo II). Como valores de pH mais ácidos proporcionam melhores recuperações para a continuidade do trabalho foi escolhido o valor de 2.

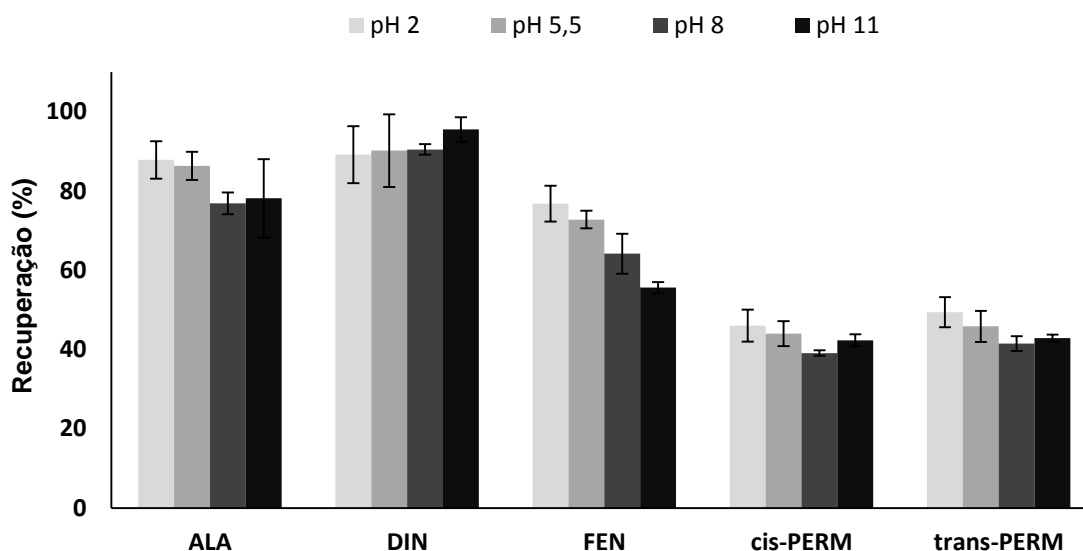


Figura 3.8 - Efeito do pH na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm); retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

#### 3.4.4. Efeito do modificador orgânico

Um fenómeno que por vezes ocorre neste tipo de metodologias é a adsorção dos analitos à parede de vidro dos frascos de amostragem (“wall-effect”), muito comum em técnicas baseadas em sorção estática [20]. Como seria de esperar, sempre que este fenómeno ocorre, a eficiência de extração é diminuída. Para contornar este problema é comum adicionar-se MeOH como modificador orgânico da matriz aquosa. No entanto, a adição deste pode aumentar a adição de solutos na fase aquosa, e assim, minimizar a eficiência na extração. Para compostos com elevado  $\log K_{OW}$  ( $> 5,0$ ) a adição de MeOH minimiza a adsorção dos analitos no vidro do vial, enquanto que para compostos com  $\log K_{OW}$  mais baixo ( $< 2,5$ ) a adição de MeOH aumenta a solubilidade dos analitos na matriz aquosa [14].

Neste sentido foram realizados ensaios por adição de 0, 5, 10 e 15 % de MeOH (v/v) nas amostras de água fortificada com os compostos. Na figura 3.9 encontra-se a representação gráfica dos resultados obtidos, onde se verifica que o aumento gradual de MeOH na matriz produz um ligeiro aumento das recuperações dos analitos, embora se tenha constatado que no caso da adição de 15 % MeOH seja notável uma redução acentuada em todos os analitos em estudo. Estes resultados demonstram que após adição de 15 % MeOH a recuperação diminui o que pode ser explicado pelo facto da

adição de MeOH tornar a matriz menos polar, promovendo uma maior solubilidade dos compostos mais apolares no meio aquoso, o que reduz a sua afinidade para com a fase polimérica e diminui a eficiência de extração. Por conseguinte, foi selecionado 10 % de MeOH como teor em modificador orgânico a adicionar nas seguintes etapas de otimização.

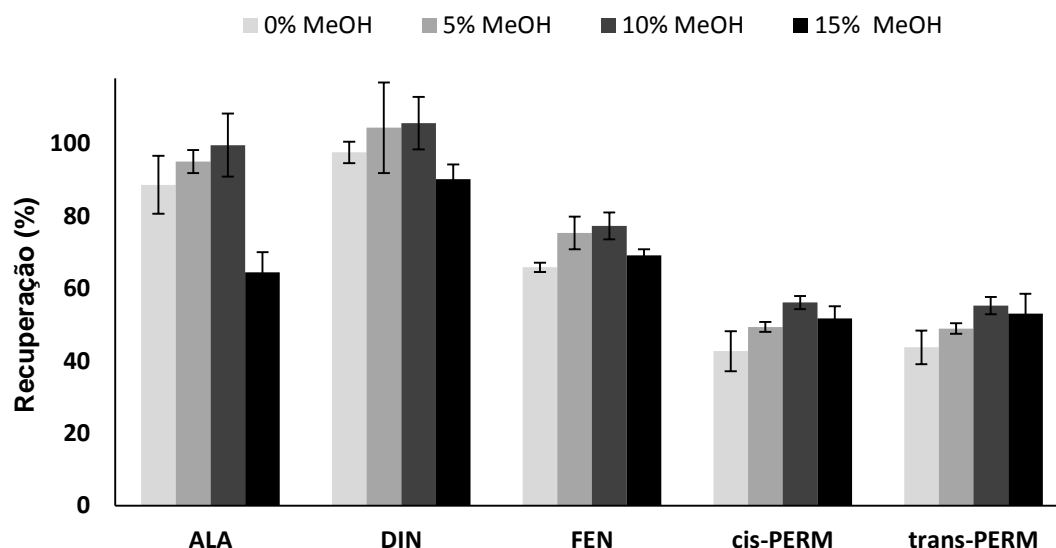


Figura 3.9 - Efeito do modificador orgânico na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm), pH 2; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

### 3.4.5. Efeito da força iônica

O efeito de força iônica consiste em diminuir a solubilidade dos analitos em meio aquoso, tornando-os mais hidrofóbicos, promovendo maior retenção dos analitos no sorvente e, consequentemente, o aumento da eficiência de recuperação [47]. Esta evidência é verificada para compostos com um baixo  $\log K_{OW}$  onde a força iônica, que é controlada normalmente pela adição de NaCl, é importante, uma vez que promove o efeito de “*salting out*”, pelo aumento da eficiência de extração dos compostos mais hidrofílicos [14, 48].

O efeito da força iônica na recuperação dos analitos foi estudado por adição de 0, 5, 10 e 15 % (m/v) de NaCl à matriz aquosa. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 3.10, onde é evidente que a adição de sal diminuiu claramente a

eficiência de extração, uma vez os compostos em estudo apresentarem características mais apolares ( $\log 3,52 < K_{O/W} < 6,50$  [49]).

Concluiu-se deste modo que, a adição de NaCl afeta a eficiência de extração, tendo por isso mesmo sido desprezada para o restante estudo.

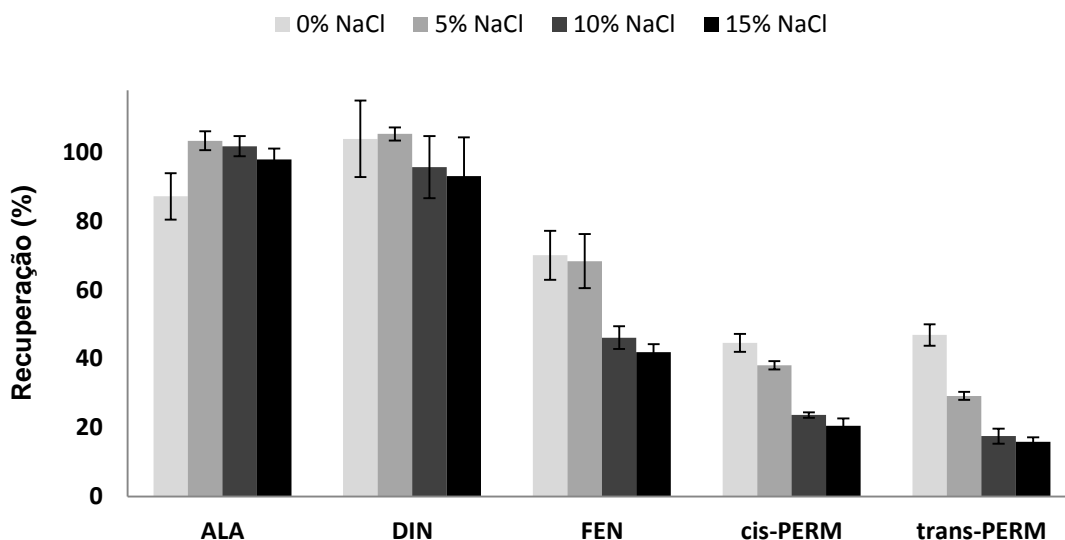


Figura 3.10 - Efeito da força iônica na recuperação dos agroquímicos em estudo. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; extração: 4 h (1000 rpm), pH 2; retro-extração: ACN, 200  $\mu\text{L}$ , 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

### 3.5. Condições experimentais otimizadas (BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM))

Concluída a otimização dos parâmetros para esta metodologia adquiriu-se um conjunto de condições otimizadas, que permitiram obter melhores condições de extração e retro-extração para os analitos em estudo, encontrando-se resumidas na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM).

Condições experimentais otimizadas		
Extração	Tempo de equilíbrio (h)	4
	Velocidade de agitação (rpm)	1000
	pH da matriz	2,0
	MeOH (%)	10
	NaCl (%)	-
Retro-extração	Tempo de retro-extração (min)	30
	Solvente de retro-extração	ACN

Utilizando as condições experimentais otimizadas, obtiveram-se recuperações médias para os cinco agroquímicos em estudo, com valores médios compreendidos entre 55,2 e 105,6% (tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM).

Agroquímicos	Recuperação (%) $\pm$ RSD (%) (n = 3)
ALA	99,5 $\pm$ 8,8
DIN	105,6 $\pm$ 6,9
FEN	77,2 $\pm$ 4,8
<i>cis</i> -PERM	56,1 $\pm$ 3,3
<i>trans</i> -PERM	55,2 $\pm$ 4,3



### 3.6. Validação do método BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM)

Após o estudo da otimização experimental, prosseguiu-se com a validação da metodologia proposta, estudando nomeadamente limiares analíticos, gama dinâmica de trabalho e precisões associadas.

#### 3.6.1. Limiares analíticos

Os limiares analíticos do método proposto para os compostos em estudo foram avaliados com recurso aos LODs e LOQs para razões S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 3.6.

Tabela 3.6 - LODs e LOQs para os cinco agroquímicos estudados, obtidos na validação do método BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM).

Agroquímicos	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )
ALA	32,0	105,6
DIN	32,0	105,6
FEN	8,0	26,4
<i>cis</i> -PERM	16,0	52,8
<i>trans</i> -PERM	8,0	26,4

#### 3.6.2. Gama de dinâmica de trabalho/linearidade

A linearidade da gama dinâmica de trabalho foi avaliada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo as regressões lineares sido aplicadas no intervalo de concentrações compreendidas entre 0,03 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (envolvendo entre cinco a seis níveis de concentrações, analisadas em triplicado) - figura IV.1. Os parâmetros obtidos das curvas de regressão linear no intervalo de concentrações estudado encontram-se representados na tabela 3.7. Dos dados encontrados observam-se coeficientes de correlação ( $r^2$ ), que apresentam valores superiores a 0,9982 (ALA).

Tabela 3.7 – Parâmetros de regressão relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.

<b>Agroquímicos</b>	<b>Gama linear (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>r^2</math></b>
ALA	0,20 – 4,0	401541,0	977,74	0,9982
DIN	0,20 – 4,0	647379,0	4740,8	0,9993
FEN	0,03 – 2,0	582001,0	17236,0	0,9986
<i>cis</i> -PERM	0,08 – 4,0	376081,0	10216,0	0,9984
<i>trans</i> -PERM	0,03 – 2,0	972582,0	5437,5	0,9992

a - Declive

b – Ordenada na origem

A precisão da metodologia foi ainda avaliada com recurso a repetibilidade (3 réplicas de um ensaio no mesmo dia) e a precisão intermédia (3 réplicas de um ensaio em 3 dias diferentes), através de ensaios fortificados com concentrações de  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados apresentados na tabela 3.8 indicam RSDs inferiores a 7,5 %, que de acordo com os requerimentos da Diretiva 98/83/EC para análise vestigial de compostos orgânicos, a metodologia proposta é considerada aceitável uma vez que apresenta precisão abaixo de 25 % [9].

Tabela 3.8 - Ensaio de precisão obtidos por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM) fortificadas com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  em condições experimentais otimizadas.

<b>Agroquímicos</b>	<b>Recuperações (%) <math>\pm</math> RSD (%)</b>	
	<b>Precisão intermédia (n = 9)</b>	<b>Repetibilidade (n = 3)</b>
ALA	94,2 $\pm$ 6,0	95,5 $\pm$ 6,8
DIN	102,7 $\pm$ 7,0	103,4 $\pm$ 7,5
FEN	80,8 $\pm$ 5,9	78,2 $\pm$ 2,8
<i>cis</i> -PERM	56,9 $\pm$ 4,6	57,0 $\pm$ 3,6
<i>trans</i> -PERM	54,6 $\pm$ 5,7	55,1 $\pm$ 4,0

### 3.7. Aplicação a matrizes reais

No sentido de avaliar a aplicabilidade da metodologia proposta, realizaram-se ensaios em matrizes reais, nomeadamente, amostras de águas superficiais e subterrâneas e ainda em amostras de vinho, usando a metodologia otimizada com auxílio do método da adição de padrão (SAM) para evitar contaminações intrínsecas e eventuais efeitos de matriz. A escolha destas três matrizes deve-se ao facto de serem referenciadas como amostras com potencial de contaminação pelos agroquímicos alvo [6, 50-53].

Numa primeira abordagem, cada matriz foi fortificada com concentrações conhecidas dos padrões de trabalho para produzir os níveis de fortificação correspondente ( $0,2-2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para os compostos em estudo. Foram ao mesmo tempo efetuados ensaios em branco, isto é, sem fortificação no sentido de assegurar o máximo controlo da metodologia analítica.

#### 3.7.1. Amostras de água superficial

A partir dos resultados obtidos pelas análises da matriz de água superficial, construíram-se as curvas de regressão correspondentes para cada analito. Conforme se observa no Anexo V (figura V.1), obteve-se boa linearidade com coeficientes de correlação superiores a 0,9980 (DIN). Na tabela 3.9 são apresentados os parâmetros de linearização obtidos com recurso ao método dos mínimos quadrados, assim como os resultados da concentração dos cinco agroquímicos que se encontram abaixo dos LODs determinados para a presente metodologia.

Tabela 3.9 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de água superficial obtida por BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas.

Amostra (local)	Agroquímicos	a	b	$r^2$	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Rio Alviela	ALA	89267,0	21342,0	0,9988	< LOD
	DIN	897967,0	41722,0	0,9980	< LOD
	FEN	1000000,0	9997,1	0,9993	< LOD
	<i>cis</i> -PERM	662506,0	1035,8	0,9993	< LOD
	<i>trans</i> -PERM	2000000,0	8258,2	0,9995	< LOD

a - Declive

b – Ordenada na origem

A figura 3.11 exemplifica um cromatograma correspondente à amostra de água superficial fortificada com  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , segundo a metodologia proposta sob condições experimentais otimizadas, onde pode ser observada notável seletividade e sensibilidade alcançados.

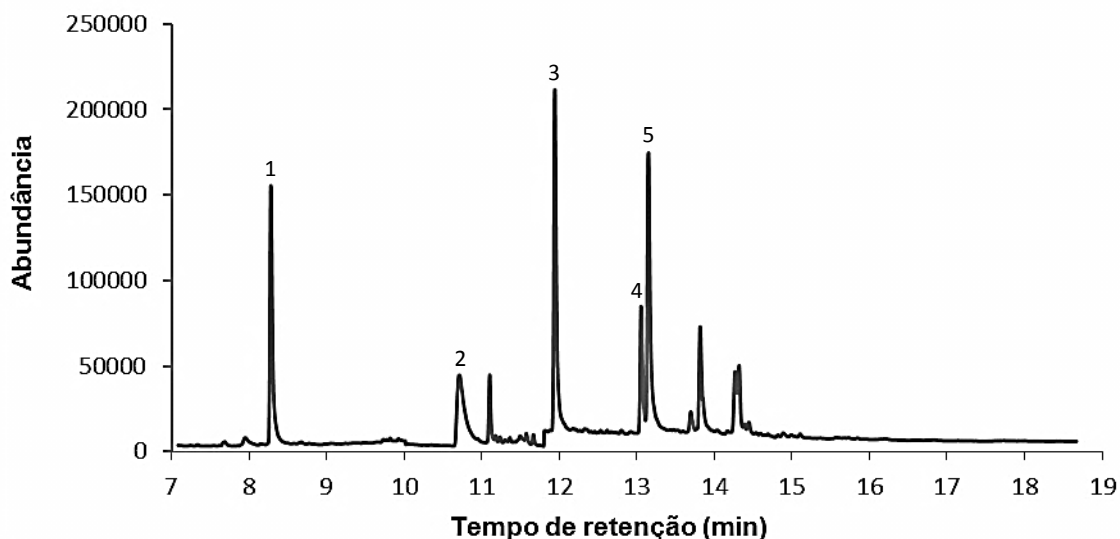


Figura 3.11 - Cromatograma relativo à amostra de água superficial fortificada a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  obtido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM).

### 3.7.2. Amostras de água subterrânea

As curvas de regressão obtidas para a matriz de água subterrânea observadas no Anexo V (figura V.2) demonstram ótima linearidade com coeficientes de correlação superiores a 0,9962 (ALA). Os valores obtidos por aplicação do método dos mínimos quadrados e as concentrações encontradas na amostra de água subterrânea estão apresentados na tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de água subterrânea obtida por BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

Amostra (local)	Agroquímicos	a	b	$r^2$	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Poço (Santarém)	ALA	704804,0	11863,0	0,9962	< LOD
	DIN	985990,0	8274,0	0,9970	< LOD
	FEN	795164,0	15742,0	0,9983	< LOD
	<i>cis</i> -PERM	532441,0	11727,0	0,9977	< LOD
	<i>trans</i> -PERM	1000000,0	21353,0	0,9988	< LOD

a - Declive

b – Ordenada na origem

A figura 3.12 apresenta um cromatograma correspondente à amostra de água subterrânea fortificada com  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , no qual foi possível identificar os analitos ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM, determinados por aplicação do SAM com significativa qualidade analítica.

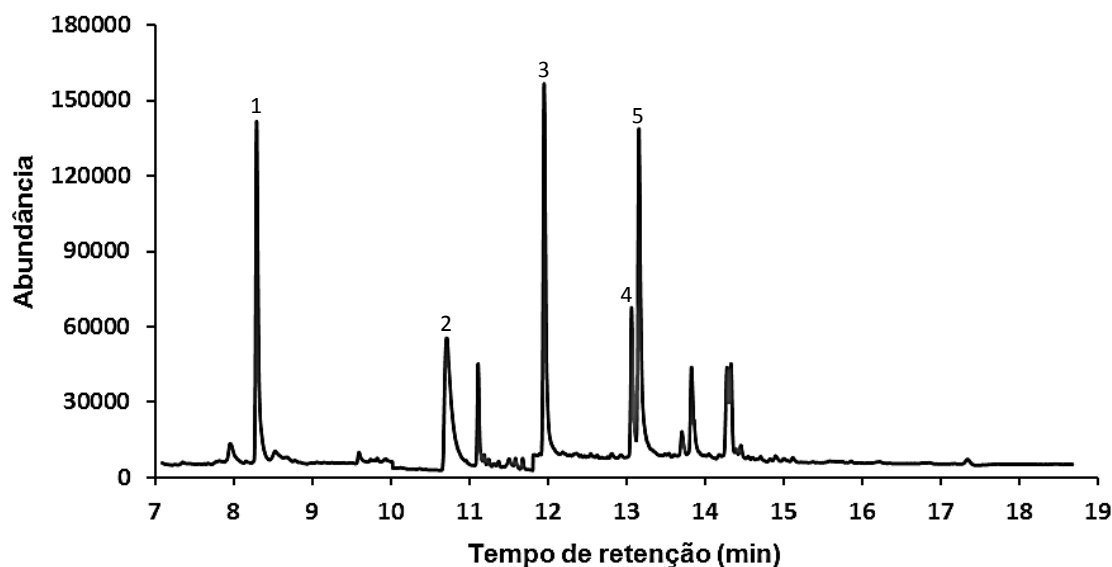


Figura 3.12 - Cromatograma relativo à amostra de água subterrânea fortificada a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  obtido por BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM).

**3.7.3. Amostras de vinho**

Ensaio efetuados em amostras de vinho constataam que o método apresentou ótima linearidade, como se verifica pelas curvas de calibração com coeficientes de correlação superiores a 0,9911 (FEN) obtidas e observada no Anexo V (figura V.3). Os valores de concentração determinados pelo SAM bem como os parâmetros de linearização obtidos através do método dos mínimos quadrados, encontram-se na tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de vinho obtida por BAμE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

<b>Amostra (local)</b>	<b>Agroquímicos</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
Vinho tinto (Produtor)	ALA	175838,0	16007,0	0,9942	< LOD
	DIN	89238,0	6869,4	0,9946	< LOD
	FEN	243600,0	22785,0	0,9911	< LOD
	<i>cis</i> -PERM	46425,0	727,27	0,9979	< LOD
	<i>trans</i> -PERM	114058,0	6899,6	0,9960	< LOD

a - Declive

b – Ordenada na origem

A figura 3.13 exemplifica o cromatograma correspondente à amostra de vinho fortificada com  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , no qual foi possível identificar os analitos ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM, determinados por aplicação do SAM com notável seletividade e sensibilidade analítica.

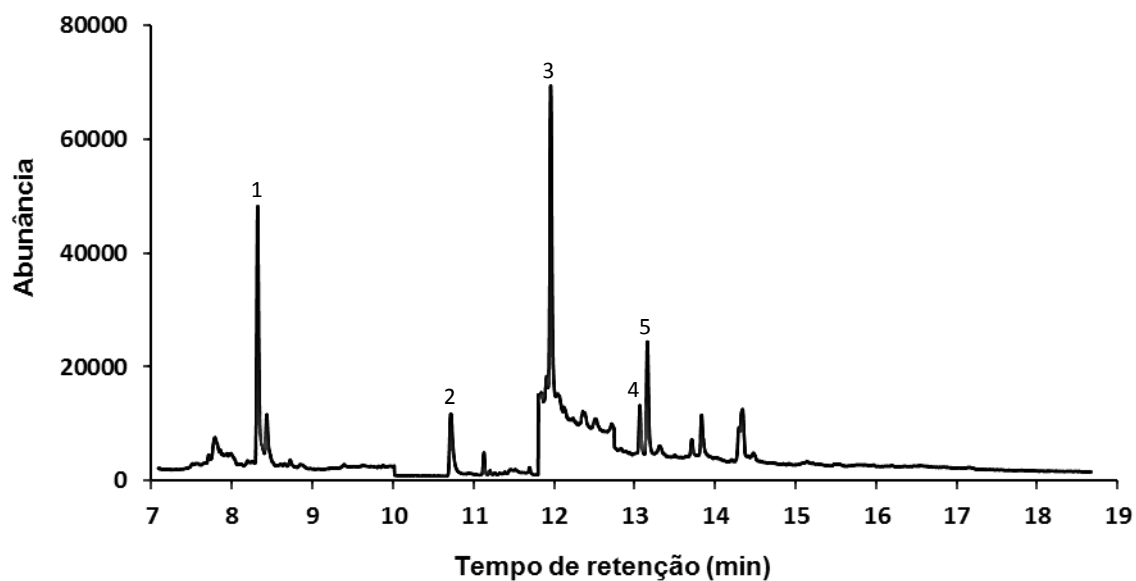


Figura 3.13 - Cromatograma relativo à amostra de vinho fortificada a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  obtido por BA $\mu$ E(P1)-LD/LVIC-GC-MS, nas condições experimentais otimizadas (1- ALA; 2- DIN; 3- FEN; 4- *cis*-PERM; 5- *trans*-PERM).





#### ***4. Conclusão e perspectivas futuras***

---



O presente estudo propõe uma nova metodologia (BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM)), que demonstrou ser simples, robusta e adequada na monitorização de cinco agroquímicos modelo (ALA, DIN, FEN e isómeros *cis/trans*-PERM) em amostras de água superficial, água subterrânea e vinho.

A otimização dos parâmetros instrumentais (LVI-GC-MS(SIM)) demonstrou que o sistema instrumental utilizado é apropriado para a análise vestigial dos agroquímicos em estudo. A otimização da resolução dos analitos foi executada num tempo inferior a 19 min, tendo-se determinado, os LODs e LOQs para os cinco analitos com base na razão S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. Os LODs obtidos foram de 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ALA), 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (FEN), 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (*trans*-PERM) e 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (DIN e *cis*-PERM), tendo os LOQs encontrados sido de 13,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ALA), 16,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (FEN), 0,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  (*trans*-PERM) e 1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  (DIN e *cis*-PERM). Verificou-se ainda boa precisão instrumental (RSD < 16,0 %) e excelente linearidade ( $r^2 > 0,9972$ ) na gama de trabalho compreendida entre 2,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para otimização experimental começou por se selecionar o material sorvente tendo-se testado quatro fases sorventes, estando envolvidos três ACs e um polímero. O sorvente que demonstrou maior seletividade e eficiência de extração foi o polímero à base PS-DVB (P1).

Posteriormente, para otimização da metodologia, estudaram-se diversos parâmetros que poderiam afetar quer a micro-extração quer retro-extração dos agroquímicos em estudo. As condições otimizadas encontradas para os compostos estudados foram 4 h de tempo de equilíbrio (1000 rpm), pH 2, 10 % MeOH e 30 min para dessorção com ACN sob tratamento ultrasónico. A otimização permitiu alcançar recuperações médias compreendidas entre 55,2 e 105,6 % para os analitos em estudo, respetivamente, em amostras de água fortificada para um nível de 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Terminada a otimização do método, procedeu-se à respetiva validação, tendo-se verificado um acentuado decréscimo nos LODs e LOQs para valores compreendidos entre 8,0 – 32,0 ng L<sup>-1</sup> e 26,4 – 105,6 ng L<sup>-1</sup>. A gama de trabalho estudada (0,03 e 4,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) demonstrou boa linearidade ( $r^2 > 0,9982$ ), com precisões intermédias (RSD < 7 %) e repetibilidades (RSD < 7,5 %) adequadas.

O método desenvolvido (BA $\mu$ E(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM)) foi seguidamente aplicado a matrizes reais, nomeadamente amostras de água superficial, água subterrânea e vinho. Os estudos efetuados nas matrizes reais fortificadas, com recurso ao método da

adição de padrão, permitiram alcançar linearidades adequadas ( $r^2 > 0,9911$ ), não se tendo detetado concentrações vestigiais ( $< LODs$ ) dos cinco agroquímicos em causa.

Em suma e tendo em conta a complexidade das matrizes estudadas, a metodologia é fácil de desenvolver, rápida de validar e requer quantidades reduzidas de amostras e solventes orgânicos, demonstrando ser uma abordagem analítica “amiga do ambiente”. Comparativamente com as técnicas SPME e SBSE, a BAμE evidência grande capacidade, maior abrangência (multiresíduo) relativamente ao tipo de compostos envolvidos e custos mais baixos.

Como perspectivas futuras, propõe-se a aplicação desta metodologia a uma gama mais alargada de agroquímicos de outras classes e famílias por forma a demonstrar a sua maior abrangência, assim como capacidade analítica que garanta melhor fiabilidade dos resultados. O estudo a outras matrizes é igualmente importante no sentido de demonstrar uma maior aplicabilidade da metodologia proposta. Sugere-se ainda a utilização de equipamentos de análise alternativos como o LC e outras técnicas tandem (LC-MS/MS) para a determinação e quantificação de agroquímicos involáteis e/ou termolábeis, tornando esta metodologia ainda mais alargada na monitorização vestigial de agroquímicos.

## ***5. Referências bibliográficas***

---



- [1] J.E. Casida e G.B. Quistad, *Golden age of insecticide research: past, present, or future?* Annu Rev Entomol, 1998. **43**: p. 1-16.
- [2] K.A. Aliferis e S. Jabaji, *Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2011. **100**(2): p. 105-117.
- [3] Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O e R. B, *Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011. **8**: p. 2265-2303.
- [4] *Food and Agricultural Organization of the United Nation*, 1997.
- [5] B. Ballantyne e T.C. Marrs, *Pesticides: An Overview of Fundamentals - Pesticide Toxicology and International Regulation*. John Wiley & Sons, Ltd, 2004, 1-23.
- [6] M.J. Cerejeira, P. Viana, S. Batista, T. Pereira, E. Silva, M.J. Valério, A. Silva, M. Ferreira e A.M. Silva-Fernandes, *Pesticides in Portuguese surface and ground waters*. Water Research, 2003. **37**(5): p. 1055-1063.
- [7] P.A.O. Gonçalves, Contributo para a Tomada de Decisão no Uso Sustentável de Pesticidas em Vinha - Avaliação do Perigo de Pesticidas em Recursos Hídricos do Alentejo Central Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, 2008.
- [8] J. Xie, T. Liu, G. Song, Y. Hu e C. Deng, *Simultaneous Analysis of Organophosphorus Pesticides in Water by Magnetic Solid-Phase Extraction Coupled with GC–MS*. Chromatographia, 2013. **76**(9-10): p. 535-540.
- [9] Directa 98/83/CE do Conselho da União Europeia relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 330, 1998, 32-54
- [10] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo Díez, C. Panis e M.P. San Andrés, *Determination of triazine herbicides by capillary liquid chromatography with on-column focusing and temperature gradient*. Analytica Chimica Acta, 2001. **445**(1): p. 29-34.
- [11] P. Serodio e J.M. Nogueira, *Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large-volume injection capillary gas chromatographic-mass*

- spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. Anal Bioanal Chem*, 2005. **382**(4): p. 1141-51.
- [12] E. Herrero-Hernandez, E. Pose-Juan, A. Alvarez-Martin, M.S. Andrades, M.S. Rodriguez-Cruz e M.J. Sanchez-Martin, *Pesticides and degradation products in groundwaters from a vineyard region: optimization of a multiresidue method based on SPE and GC-MS. J Sep Sci*, 2012. **35**(24): p. 3492-500.
- [13] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpont e P. Sandra, *Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. Journal of Separation Science*, 2005. **28**(9-10): p. 1083-1092.
- [14] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria e O. Zuloaga, *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(16): p. 2642-2666.
- [15] J.M.F. Nogueira, *Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. Analytica Chimica Acta*, 2012. **757**(0): p. 1-10.
- [16] A.M. Carro, S. Fernández, I. Racamonde, D. García-Rodríguez, P. González e R.A. Lorenzo, *Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization-large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry for multiclass pesticides in water. Journal of Chromatography A*, 2012. **1253**(0): p. 134-143.
- [17] M.A. Farajzadeh, D. Djozan, N. Nouri, M. Bamorowat e M.S. Shalamzari, *Coupling stir bar sorptive extraction-dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples followed by GC-FID and GC-MS determinations. J Sep Sci*, 2010. **33**(12): p. 1816-28.
- [18] C. Almeida, R. P., P. Serôdio e J.M.F. Nogueira, *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 2004. **95**: p. 69-77.



- [19] F. David e P. Sandra, *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1–2): p. 54-69.
- [20] E. Baltussen, P. Sandra, F. David e C.A. Cramers, *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles*. Journal of Microcolumn Separations, 1999. **11:10**: p. 737 - 747.
- [21] F.M. Lancas, M.E. Queiroz, P. Grossi e I.R. Olivares, *Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction*. J Sep Sci, 2009. **32**(5-6): p. 813-24.
- [22] L. Abdulra'uf e G. Tan, *Review of SBSE Technique for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables*. Chromatographia, 2013: p. 1-10.
- [23] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho e J.M. Nogueira, *Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA<sub>mu</sub>E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices*. Talanta, 2011. **83**(5): p. 1643-9.
- [24] L.S. Ettre, *Chromatography: The separation technique of the 20th century*. Chromatographia, 2000. **51**(1-2): p. 7-17.
- [25] Gerstel.org - Twister/ Stir Bar Sportive Extraction SBSE. Atualização em 2014. Acesso em Junho de 2014. disponível em: <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>
- [26] J.M.F. Nogueira, *Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): Uma metodologia inovadora para microextração estática*. Scientia Chromatographica, 2012. **4**(4): p. 259-269.
- [27] N.R. Neng, A.R.M. Silva e J.M.F. Nogueira, *Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(47): p. 7303-7310.
- [28] C. Almeida e J.M.F. Nogueira, *Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices*. Journal of Chromatography A, 2012. **1265**(0): p. 7-16.
- [29] N.R. Neng e J.M.F. Nogueira, *Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA*

- mu E) with in situ derivatization*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **398**(7-8): p. 3155-3163.
- [30] J.M.F. Nogueira, *Mikhail Tswett Um legado para a cromatografia moderna*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2006: p. 51-56.
- [31] *Nobelprize.org - All Nobel Prizes in Chemistry*. Atualização em 2014. Acesso em Junho de 2014. disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1952/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/)
- [32] D. Harvey, *Modern Analytic Chemistry*. International Edition ed. EUA: McGraw-Hill Companies, Inc., 2000.
- [33] D.A. Skoog, F.J. Holler e S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 6<sup>a</sup> ed. Belmont: Thomson & Brooks/Cole, 2007.
- [34] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* 6<sup>a</sup> ed. New York W. H. Freeman, 2003.
- [35] J.W. Robinson, E.M.S. Frame e G.M.F. II, *Undergraduate Instrumental Analysis*. 6<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 2005.
- [36] F.C.M. Portugal, Desenvolvimento, Optimização e Aplicação de Novas Fases Poliméricas (Poliuretanos) para Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE) Departamento de Química e Bioquímica 2010.
- [37] H.-J. Hübschmann, *Fundamentals in Handbook of GC/MS*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, 7-292.
- [38] *Chromacademy.com - LC-GC's Chromacademy powered by crawford scientific*. Atualização em 2014. Acesso em Junho de 2014. disponível em: <http://www.chromacademy.com/index.html>
- [39] *Sigma-Aldrich Co. LLC. All*. Atualização em 2014. Acesso em Junho de 2014. disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>
- [40] D. García-Rodríguez, R. Cela-Torrijos, R.A. Lorenzo-Ferreira e A.M. Carro-Díaz, *Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry detection*. Food Chemistry, 2012. **135**(1): p. 259-267.

- [41] D. Štajnbaher e L. Zupančič-Kralj, *Optimisation of programmable temperature vaporizer-based large volume injection for determination of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1190**(1–2): p. 316-326.
- [42] C. Almeida e J.M.F. Nogueira, *Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases*. Journal of Chromatography A, 2014. **1348**(0): p. 17-26.
- [43] N.R. Neng e J.M. Nogueira, *Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(3): p. 1355-64.
- [44] C. Almeida, A. Stepkowska, A. Alegre e J.M. Nogueira, *Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases*. J Chromatogr A, 2013. **1311**: p. 1-10.
- [45] J.M.F. Nogueira, *Microextração adsortiva em barra (BA $\mu$ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática*. Scientia Chromatographica, 2013. **5**(4): p. 1-9.
- [46] Marvin6.2.2. - ChemAxon. . Atualização em 2014. Acesso em Junho de 2014. disponível em: <http://www.chemaxon.com>
- [47] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal e J.M.F. Nogueira, *Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases*. Journal of Chromatography A, 2008. **1209**(1–2): p. 10-16.
- [48] F. Portugal, M. Pinto e J. Nogueira, *Optimization of Polyurethane Foams for Enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices*. Talanta, 2008. **77**(2): p. 765-773.
- [49] USEPA - *Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v4.11*, United States Environmental Protection Agency. Atualização em 2012. Acesso em Junho de 2014. disponível em: <http://www.epa.gov/>

- [50] T.A. Albanis, D.G. Hela, T.M. Sakellarides e I.K. Konstantinou, *Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography*. J Chromatogr A, 1998. **823**(1-2): p. 59-71.
- [51] R. Montes, I. Rodriguez, M. Ramil, E. Rubi e R. Cela, *Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(29): p. 5459-66.
- [52] Y.R. Tahboub, M.F. Zaater e Z.A. Al-Talla, *Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2005. **1098**(1-2): p. 150-155.
- [53] M.L. Feo, E. Eljarrat, D. Barceló e D. Barceló, *Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(7): p. 692-705.

## *Anexos*

---



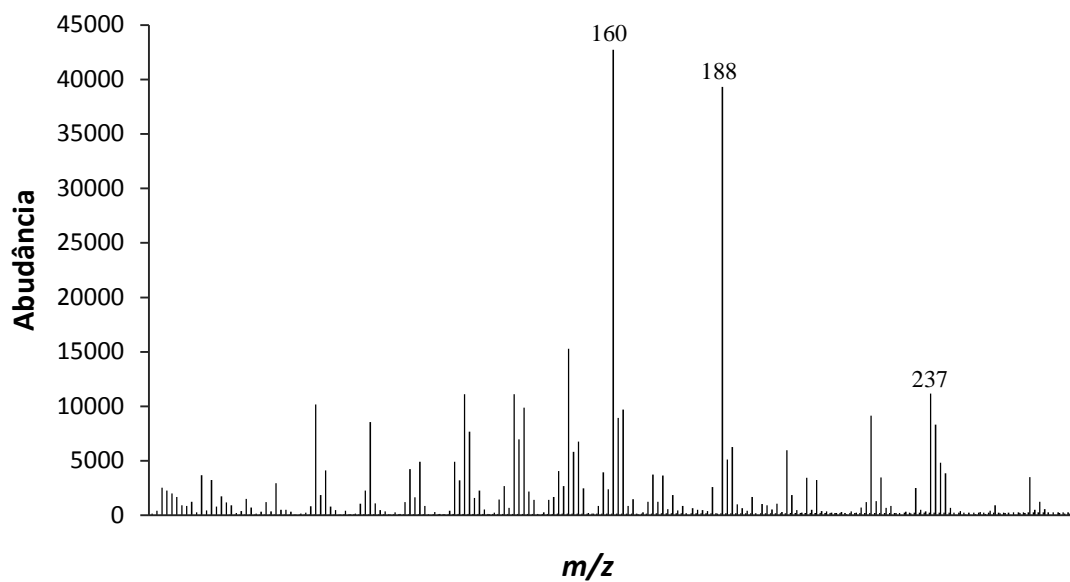
**Anexo I. – Espectros de massa dos compostos estudados obtidos por GC-MS**

Figura I.1- Espectro de massa caraterístico do ALA.

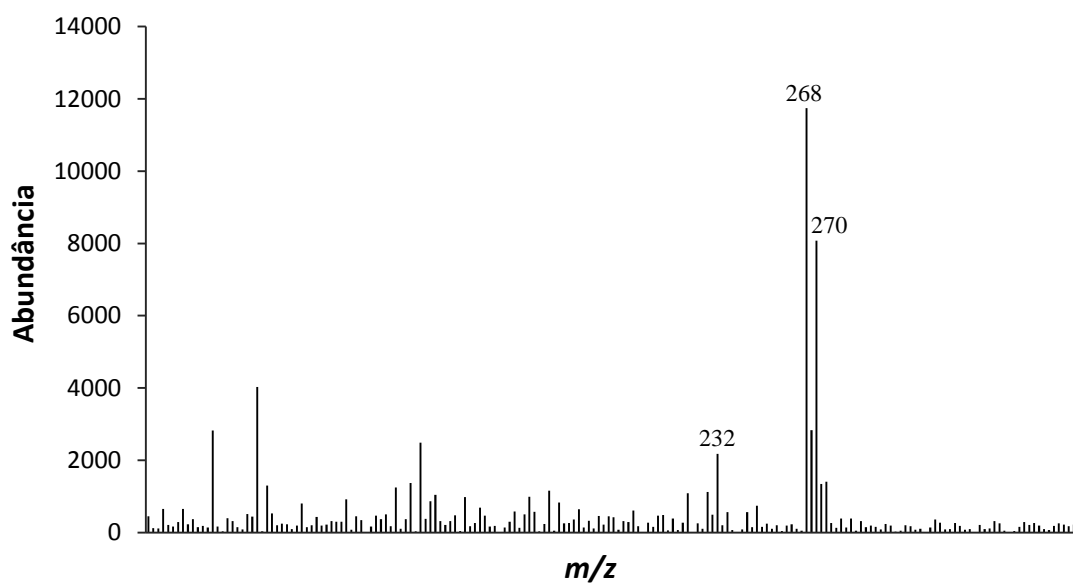


Figura I.2 - Espectro de massa caraterístico do DIN.

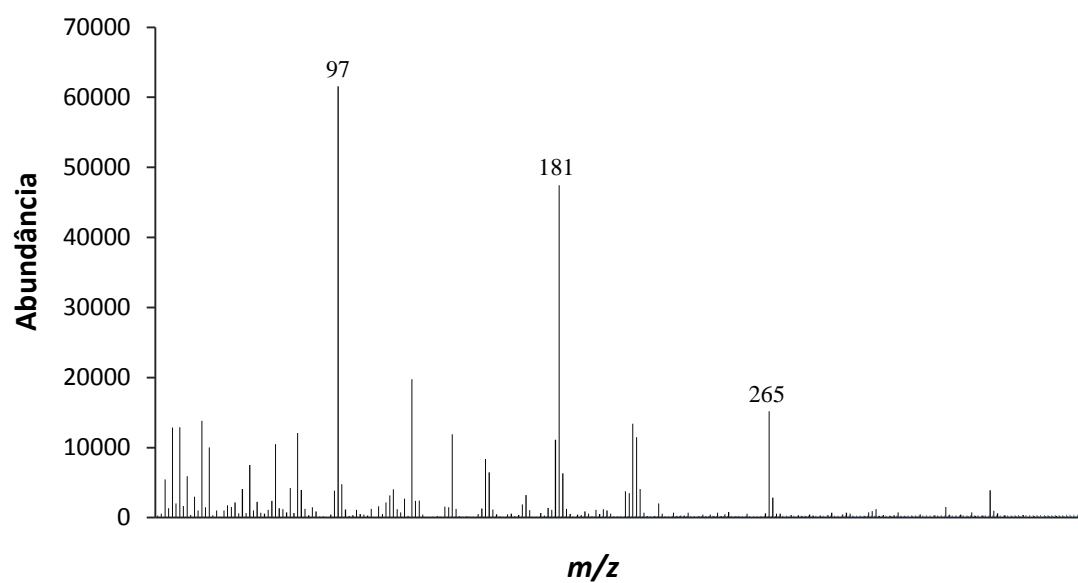


Figura I.3 - Espectro de massa caraterístico do FEN.

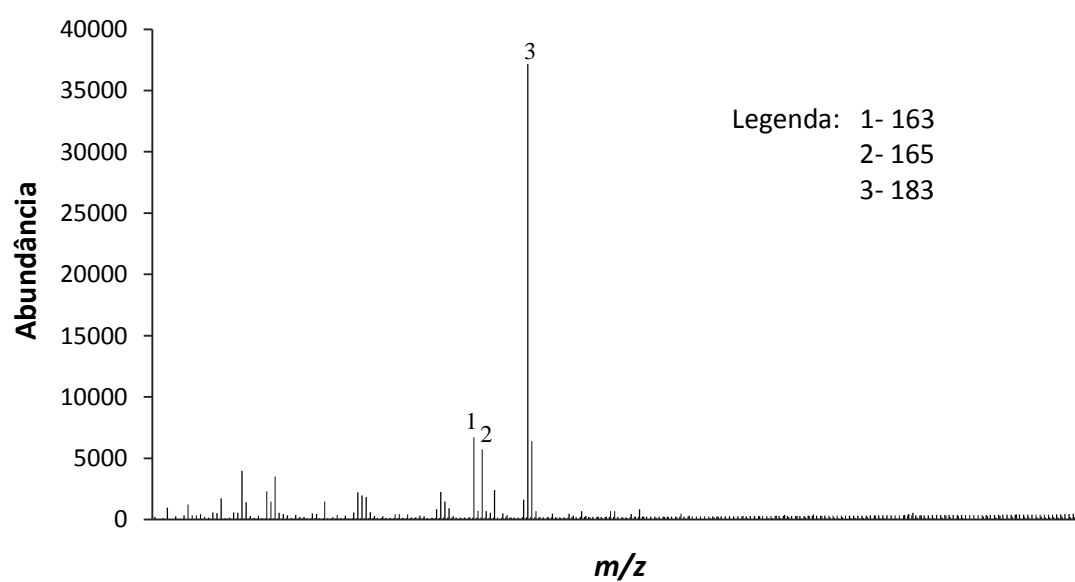


Figura I.4 - Espectro de massa caraterístico da *cis*-PERM.



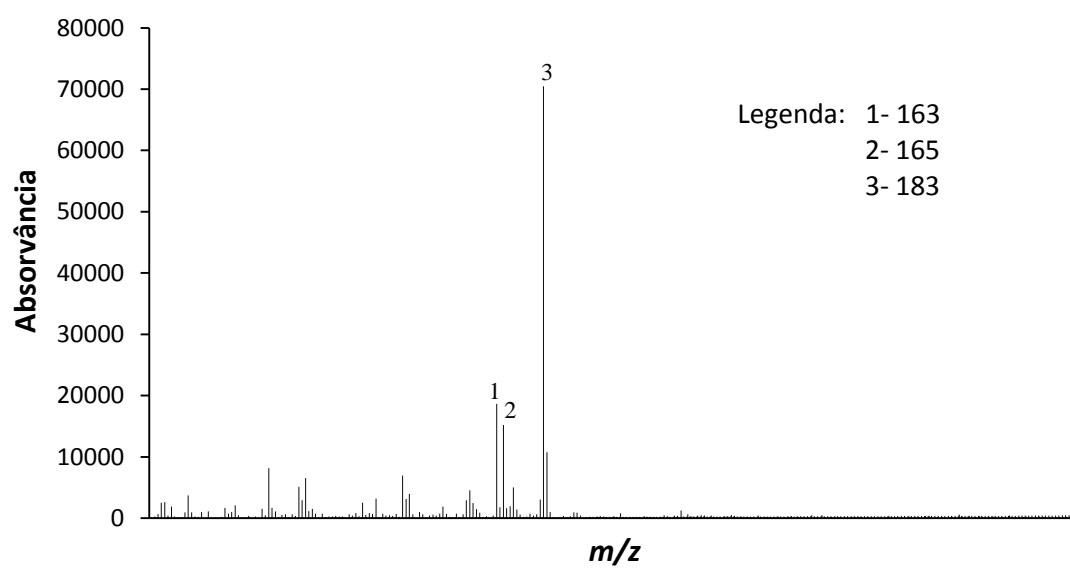


Figura I.5 - Espectro de massa característico da *trans*-PERM.

**Anexo II. – Especificação dos compostos em função do pH obtidos pelo programa Marvin 6.2.2.**

ALA

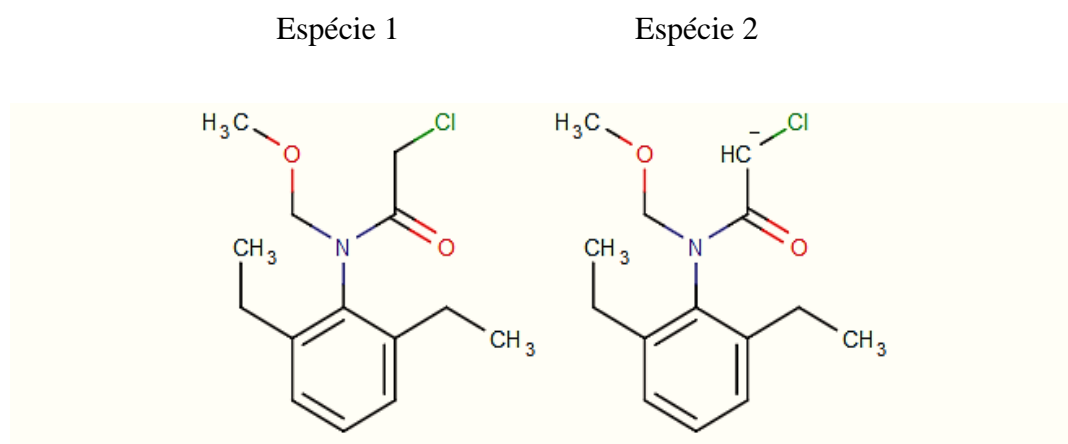


Figura II.1 - Possíveis formas de ionização de ALA obtidas pelo programa Marvin 6.2.2.

Tabela II.1 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de ALA em função do pH.

pH	Concentração (%)	
	Espécie 1	Espécie 2
0,20	100,00	0,00
1,00	100,00	0,00
2,00	100,00	0,00
3,00	100,00	0,00
4,00	100,00	0,00
5,00	100,00	0,00
6,00	100,00	0,00
7,00	100,00	0,00
8,00	100,00	0,00
9,00	100,00	0,00
10,00	100,00	0,00
11,00	100,00	0,00
12,00	100,00	0,00
13,00	99,98	0,02
14,00	99,75	0,25

DIN

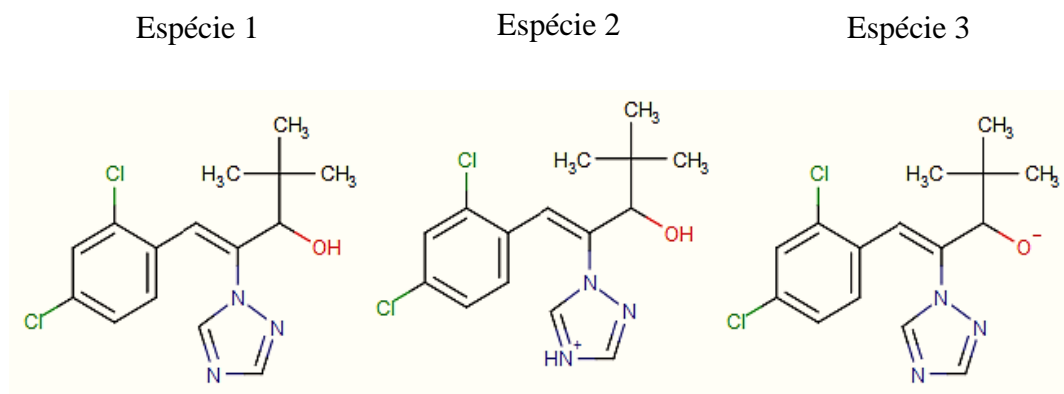


Figura II.2 - Possíveis formas de ionização de DIN obtidas pelo programa Marvin 6.2.2.

Tabela II.2 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de DIN em função do pH.

pH	Concentração (%)		
	Espécie 1	Espécie 2	Espécie 3
0,20	1,92	98,03	0,00
1,00	11,00	88,95	0,00
2,00	55,28	44,70	0,00
3,00	92,52	7,48	0,00
4,00	99,20	0,80	0,00
5,00	99,92	0,08	0,00
6,00	99,99	0,01	0,00
7,00	100,00	0,00	0,00
8,00	100,00	0,00	0,00
9,00	100,00	0,00	0,00
10,00	99,98	0,00	0,02
11,00	99,79	0,00	0,21
12,00	97,93	0,00	2,07
13,00	82,54	0,00	17,46
14,00	32,10	0,00	67,90

FEN

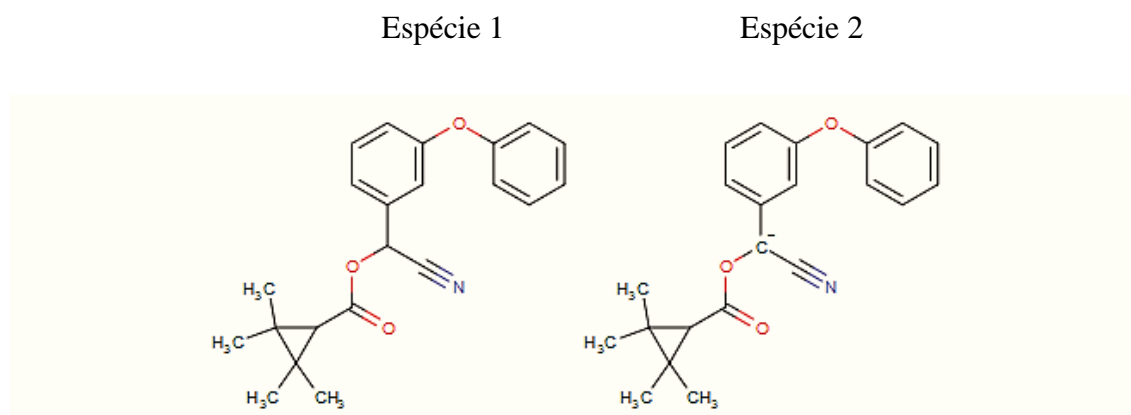


Figura II.3 - Possíveis formas de ionização de FEN obtidas pelo programa Marvin 6.2.2.

Tabela II.3 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de FEN em função do pH.

pH	Concentração (%)	
	Espécie 1	Espécie 2
0,20	100,00	0,00
1,00	100,00	0,00
2,00	100,00	0,00
3,00	100,00	0,00
4,00	100,00	0,00
5,00	100,00	0,00
6,00	100,00	0,00
7,00	99,98	0,02
8,00	99,76	0,24
9,00	97,65	2,35
10,00	80,62	19,38
10,60	51,10	48,90
11,00	29,38	70,62
12,00	3,99	96,01
13,00	0,41	99,59
14,00	0,04	99,96

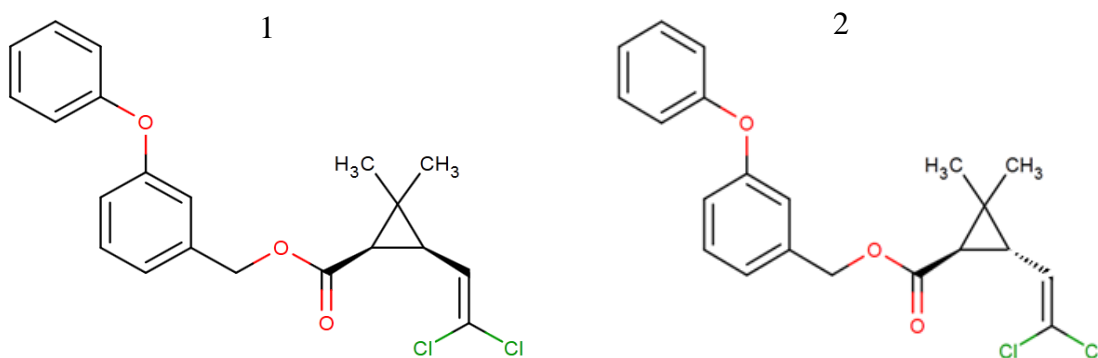
*cis/trans*-PERM

Figura II.4 - Representação das moléculas *cis*(1)/*trans*(2)-permetrina

Ambas as espécies são muito estáveis e não sofrem ionização.

**Anexo III. – Curvas de calibração instrumental (LVI-GC-MS(SIM))**

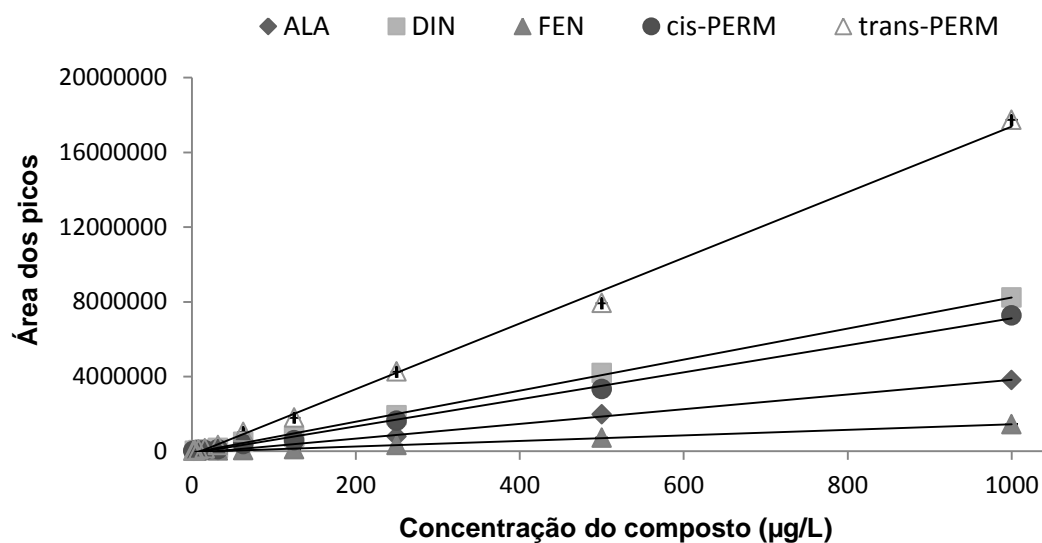


Figura III.1- Curvas de calibração instrumental obtidas para os cinco agroquímicos em estudo.

**Anexo IV. – Curvas de calibração do método BAµE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM)**

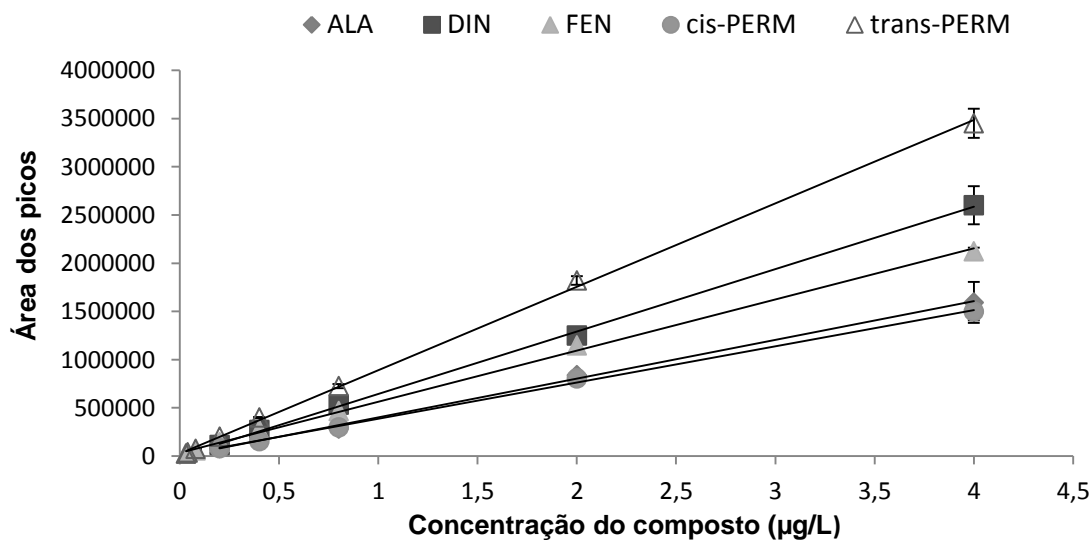


Figura IV.1- Curvas de calibração do método obtidas para os cinco agroquímicos em estudo.

**Anexo V. – Curvas de calibração obtidas pelo método da adição de padrão para as matrizes reais**

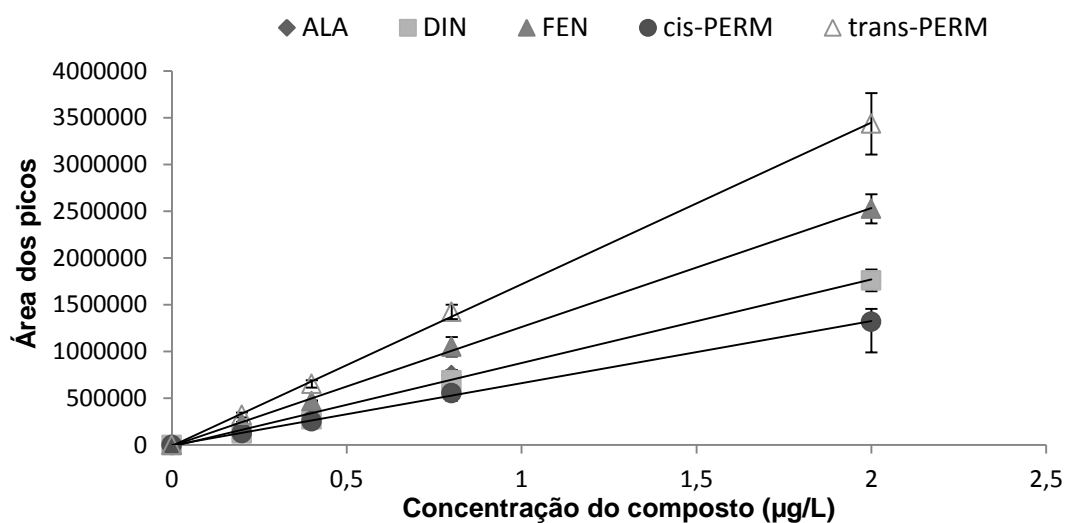


Figura V.1 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de água superficial obtida por BAµE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

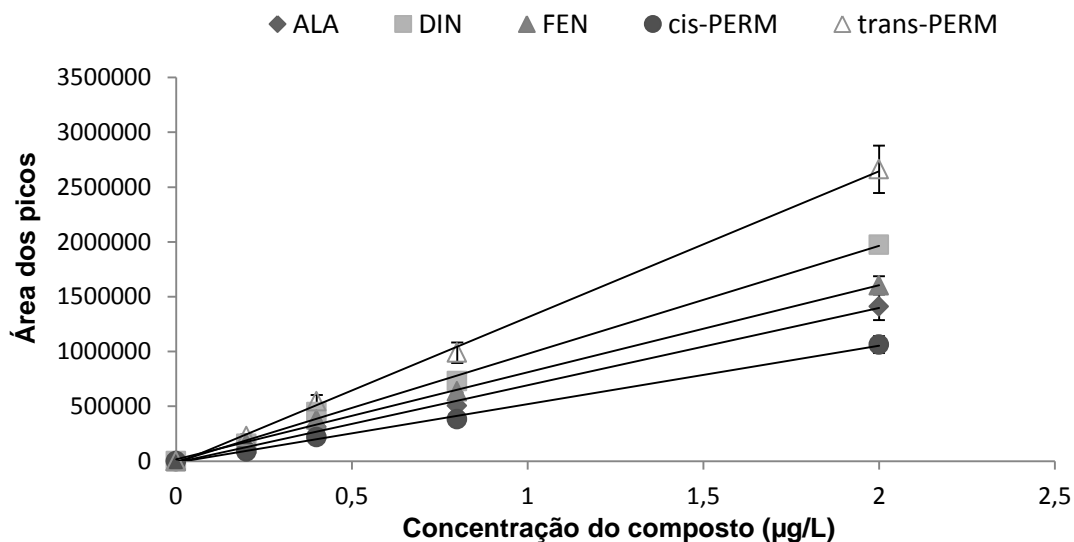


Figura V.2 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de água subterrânea obtida por BAµE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

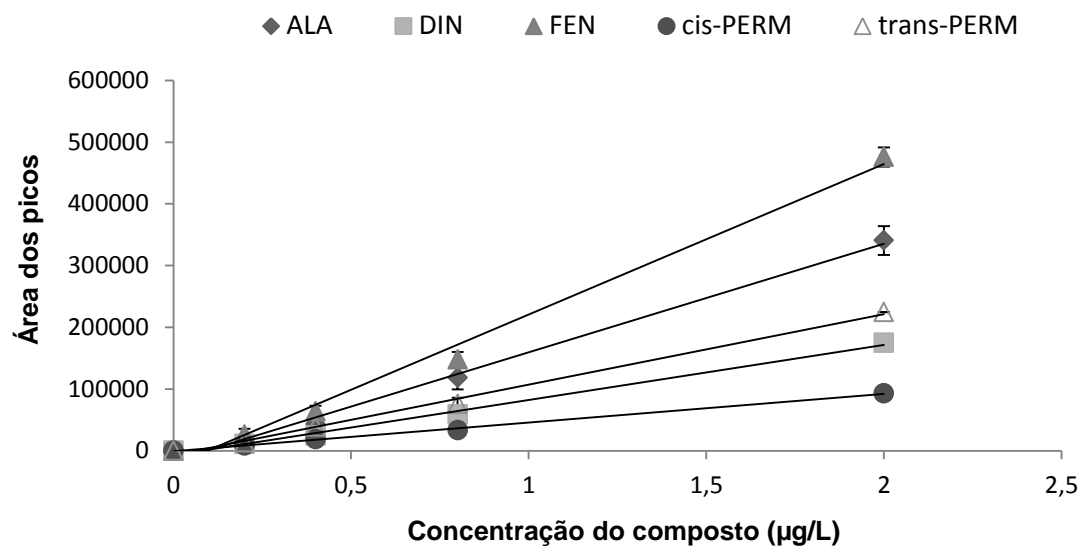


Figura V.3 - Curvas de calibração do ALA, DIN, FEN, *cis* e *trans*-PERM obtidas pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra de vinho obtida por BAµE(P1)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.



**Anexo VI. – Fórmulas utilizadas para o cálculo das recuperações**

O cálculo da média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização), foram efetuados com recurso às funções pré-definidas no software Microsoft Excel. No caso do desvio padrão relativo (RSD) não se encontra pré-definido, sendo por isso utilizada a seguinte relação:

$$\text{RSD} = \left( \frac{\sigma}{\bar{x}} \right) \times 100\%$$

O cálculo da recuperação foi efetuado através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \left( \frac{A_{\text{obt}}}{A_{\text{esp}}} \right) \times 100\%$$

em que  $A_{\text{obt}}$  é a área obtida e  $A_{\text{esp}}$  é a área esperada dos picos para cada composto.